



# Thai Journal of Pharmacology

www.phartherst.or.th

วารสารเภสัชวิทยา

Official Publication of  
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

## Contents

### Editorial

#### Letter to editors

#### Research articles

No evidence for the actions of 'clonidine-displacing substance' at alpha 2-adrenoceptors

Relationship of time and serum concentrations of Russell's viper venom with blood coagulating factors and renal hemodynamics in anesthetized dogs injected with Russell's viper venom and the effect of dopamine plus furosemide

#### Reviews

The mechanism of autonomic nervous system in the regulation of insulin secretion

Treatment of hair loss

#### New drugs

Hylan G-F 20: in viscosupplementation of osteoarthritic knees

Risedronate: a new drug for osteoporosis and Paget's disease

#### Phytomedicine

*Cimicifuga racemosa* : for management of climacteric period

#### Pharmacological digest

Sep-Dec 2000, Vol. 22, No. 3

ISSN 0125-3832

# Thai Journal of Pharmacology

is owned and published every four months by the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand.

---

## **Board of Editors**

**Editor** Supatra Srichairat

**Associate Editors** Laddawal Phivthong-ngam Suwat Wimolwattanapun  
Pravit Akarasereenont Supeecha Wittayalertpanya

**Website correspondent** Nisamanee Satyapan

## **Editorial Board**

Adisak Wongkajornsilp	Panya Khunawat
Amnuay Thithapandha	Pornpen Pramyothin
Borpit Klangkalya	Prasan Dhumma-Upakorn
Chaicharn Sangdee	Prasert Songkittiguna
Chandhanee Itthipanichpong	Sopit Thamaree
Dhasanai Suriyachan	Srichan Phornchirasilp
Kittima Sriwatanakul	Sumana Chompootaweep
Krongtong Yoovathaworn	Supeecha Wittayalertpanya
Monthira Tankeyoon	Watcharee Limpanasitikul
Nisamanee Satyapan	Wittaya Tonsuwonnont
Nongluck Sookvanichsilp	Yupin Sanvarinda

**Manager** Supeecha Wittayalertpanya

**Office** Department of Pharmacology  
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University,  
Chulalongkorn Hospital, Rama 4 Road, Bangkok 10330,  
Thailand. Tel/Fax 2511965

**Notice** The opinions expressed herein are those of the authors and do not necessarily reflect the views of the editors or the publisher.

# Thai Journal of Pharmacology

Vol. 22, No. 3, Sep- Dec 2000

---

## CONTENTS

- 197 EDITORIAL
- 199 LETTER TO EDITORS
- RESEARCH ARTICLES
- 207 No evidence for the actions of 'clonidine-displacing substance' at alpha2-adrenoceptors  
*D Pinthong*
- 219 Relationship of time and serum concentrations of Russell's viper venom with blood coagulating factors and renal hemodynamics in anesthetized dogs injected with Russell's viper venom and the effect of dopamine plus furosemide  
*S Thamaree, V Sitprijja, O Harnvivatvong, N Thaworn*
- REVIEWS
- 229 The mechanism of autonomic nervous system in the regulation of insulin secretion  
*S Yibchok-anun*
- 239 Treatment of hair loss  
*S Nawanopparatsakul*
- NEW DRUGS
- 249 Hylan G-F 20: in viscosupplementation of osteoarthritic knees  
*S Teekachunhatean, C Sangdee*
- 259 Risedronate: a new drug for osteoporosis and Paget's disease  
*S K. Wattanapitayakul, S Phornchirasilp*
- PHYTOMEDICINE
- 273 *Cimicifuga racemosa* : for management of climacteric period  
*S Srichairat, S Chompootaweep*
- 285 PHARMACOLOGICAL DIGEST

**Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand**  
**Executive Committee**  
**2000 - 2002**

<b>Advisory Executive Committee</b>	Amnuay Thithapandha Chavanee Tongroach Dhasanai Suriyachan Kanchana Ketsa-ard Methi Sanpanich Orapan Matungkasombat Pakdee Pothisiri Peerapol Euswas Prasan Dhumma-Upakorn Sumana Chompoothaweep Sunan Rojanavipat Udom Chantrarakasri Wanee Taweessap
<b>President</b>	Borpit Klangkalya
<b>Pre-president</b>	Srichan Phornchirasilp
<b>Vice president</b>	Surachai Unchern
<b>Secretary General</b>	Chainarong Cherdchu
<b>Academy</b>	Kittima Sriwattanakul
<b>Treasurer</b>	Nisamaneey Sayapan
<b>Hospitality</b>	Pornthip Supavilai
<b>Editors</b>	Supatra Srichairat
<b>Register</b>	Supeecha Wittayalertpanya
<b>Committee</b>	Chaicharn Sangdee Laddawal Phivthong-ngam Mathirut Mungthin Prapawadee Puapairoj Pravit Akarasereenont Warungkana Chidchuangchai

## EDITORIAL

---

Dear readers and members,

Despite the obstacle of time and management, the Thai Journal of Pharmacology has its opportunity again to be in your hand. This issue is about 2 months late but better late than no delivery. Some members might also have a message of our annual meeting in Khon-Kaen held on 21-23 March 2001. More details of this meeting is available at the end of this issue. Together, we plan not only to continue our traditional meeting, but also to visit our members in Khon-Kaen. You might already have noticed changes in the Thai Journal of Pharmacology. In this issue, we began a new 'Phytomedicine' section, featuring on some traditional drugs originated from herbal medicine. In an attempt to investigate efficacy, toxicity as well as therapeutic uses of our traditional medicine, a review of some standardized traditional drug from Europe will be a good example of the Thai traditional drugs studies in the future. As some one said that pharmacology is quite different from most other biological sciences because it does not ask how nature works, but rather how can we change nature? Answering this question requires the integrated efforts of multiple techniques. Moreover, pharmacological investigations are the studies of what drugs do to the body and vice versa, to come to a total understanding of a drug needs also a good research management. The Thai Journal of Pharmacology aims also to reflect the many facets of pharmacology. The changing of pharmacological discipline and molecular understanding new drug of this new decade will be also informed as a **review** and in the **pharmacological digest**. The section of **letter to editors** will be provided for your forum, sharing ideas, academic argument, comment, debate and etc. You are all invited to be stakeholders in this section. So write to us, criticize us and help us. I still have a hunger with **research articles** and am looking forward to seeing you all at Khon-Kaen.

Supatra Srichairat  
Editor

## บรรณาธิการแถลง

เรียนท่านผู้อ่านและสมาชิก

ทั้ง ๆ ที่มีอุปสรรคอยู่บ้างทางด้านเวลาและการบริหารจัดการ วารสารเภสัชวิทยาก็ได้มีโอกาสถึงมือท่านอีกจนได้ ฉบับนี้ออกล่าไปเกือบ 2 เดือน ต้องขออภัยอย่างสูงมา ณ ที่นี้ แต่ออกสายยังดีกว่าไม่ออกมานะคะ ท่านสมาชิกบางท่านอาจได้รับข่าวคราวการจัดประชุมวิชาการประจำปีของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย ที่จะมีการขึ้นในวันที่ 21-23 มีนาคม 2544 นี้ ที่จังหวัดขอนแก่น รายละเอียดของการประชุมนี้มีที่ส่วนท้ายของฉบับนี้ด้วย เราวางแผนร่วมกันไว้ว่า งานประชุมครั้งนี้ไม่เพียงแต่จะสืบทอดการจัดประชุมที่ทำเป็นประจำต่อเนื่องกันมากกว่า 20 ปีแล้ว แต่ยังเป็นไปได้ไปเยี่ยมเยียนสมาชิกชาวขอนแก่นอีกด้วย ท่านคงได้สังเกตว่าวารสารเภสัชวิทยามีการเปลี่ยนแปลงบ้างเล็กน้อย ในฉบับนี้เริ่มต้นให้มีส่วนของ Phytomedicine ที่เกี่ยวกับยาแผนโบราณบางตัวที่ได้จากพืชสมุนไพร ด้วยความพยายามที่จะศึกษาถึงประสิทธิภาพ ความเป็นพิษตลอดจนประโยชน์ในการรักษาของยาแผนโบราณของเรา การทบทวนวรรณกรรมของยาแผนโบราณที่ผ่านการตรวจสอบมาตรฐานของยุโรปที่มีการศึกษามาอย่างเป็นระบบมาก่อนแล้วจะเป็นแนวทางและตัวอย่างที่ดีต่อการศึกษาเกี่ยวกับยาแผนโบราณของไทยได้ในอนาคต ดังที่มีบางท่านได้กล่าวไว้ว่า เภสัชวิทยามีความแตกต่างจากวิทยาศาสตร์ด้านชีวภาพอื่น ๆ เพราะเภสัชวิทยาไม่ได้ถามว่าธรรมชาติเป็นอย่างไร แต่กลับเป็นว่าเราจะเปลี่ยนแปลงธรรมชาติได้อย่างไร ซึ่งแน่นอนว่าเป็นไปในทางที่ดีต่อสุขภาพมนุษย์ การตอบคำถามเหล่านี้ต้องการความพยายามร่วมกันของวิธีการที่หลากหลาย ยิ่งไปกว่านี้ การทดสอบทางเภสัชวิทยาซึ่งศึกษาว่ายาทำอะไรกับร่างกายและในทางกลับกัน ที่ทำให้เข้าใจอย่างถ่องแท้ถึงตัวยานั้น ๆ ต้องการงานวิจัยที่มีการบริหารจัดการอย่างเหมาะสม วัตถุประสงค์ของวารสารเภสัชวิทยาไม่เพียงแต่ต้องการสะท้อนถึงภาพรวม ๆ ของเภสัชวิทยา แต่ยังต้องการสะท้อนถึงหลักการทางเภสัชวิทยาและความเข้าใจในระดับโมเลกุลของยาใหม่ของศตวรรษนี้ ในรูปทบทวนวรรณกรรม และใน pharmacological digest ในส่วนของจดหมายถึงบรรณาธิการจะเป็นของท่านทุกคน โดยทำหน้าที่เป็นอาศรมที่แบ่งปันความคิด ถกเถียงทางวิชาการ ให้ข้อคิด ข้อโต้แย้งและอื่นๆ ขอเชิญให้ทุกท่านได้มีส่วนร่วมในส่วนนี้ ฉะนั้น เขียนมาถึงเรา วิจารณ์ และช่วยเราบ้าง เรายังคงต้องการผลงานวิจัยจากท่านอยู่ แล้วเจอกันที่ขอนแก่น

สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

บรรณาธิการ

## LETTER TO EDITORS

## เรื่องวิเคราะห์ข้อมูล PPA

## เรียน บรรณาธิการวารสารเภสัชวิทยา

สืบเนื่องจากการดำเนินการของ ออย. เกี่ยวกับข้อมูลอันตรายจากการใช้ยา Phenylpropanolamine (PPA) โดยคณะกรรมการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมอันตรายจากการใช้ยาได้พิจารณาประเด็นดังกล่าว เมื่อ 21 พ.ย. 2543 คณะกรรมการยาได้พิจารณาแล้วเมื่อ 28 พ.ย. 2543 และพบว่า รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขได้ลงนามประกาศเป็นคำสั่งกระทรวงสาธารณสุขที่ 1140/ 2543 เมื่อ 14 ธันวาคม 2543 แล้ว โดยกำหนดให้ผู้ผลิตยาปรับเปลี่ยนนำยา PPA ออกจากสูตรตำรับยาที่ได้ขึ้นทะเบียนไว้ในประเทศไทยทุกตำรับภายใน 180 วันนั้น สมาชิกของสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย มีความสนใจเกี่ยวกับข้อมูลในรายละเอียด และความเหมาะสมในการดำเนินการของ ออย. ในเรื่องนี้อย่างมาก คณะกรรมการบริหารสมาคมฯ จึงได้มีการประชุมสรุปข้อมูล และนายกสมาคมฯ ได้สรุปข้อพิจารณาข้อเสนอแนะเสนอต่อเลขาธิการคณะกรรมการอาหารและยาแล้ว เมื่อ 21 ธันวาคม 2543 ดังปรากฏใน website ของสมาคม (<http://www.phartherst.or.th>) และในจุลสารของสมาคม ฉบับมกราคม 2544

เมื่อวันที่ 18 มกราคม 2544 นายกสมาคมฯ ได้รับเชิญจากประธานคณะกรรมการ-

ธิการการสาธารณสุข วุฒิสภา ให้ไปชี้แจงข้อมูลทางเภสัชวิทยาของยา PPA และวิเคราะห์ผลการวิจัยเกี่ยวกับการเกิดภาวะเลือดออกในสมอง ตลอดจนผลกระทบต่อผู้ช้ยา PPA จึงได้ศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมและสรุปข้อคิดเห็นจากทั้งนักวิชาการภายในประเทศและต่างประเทศ มีประเด็นที่ใคร่ชี้แจงเพิ่มเติมจากที่สรุปไว้แล้วในจุลสาร เพื่อให้สมาชิกและผู้สนใจได้รับทราบดังนี้

### 1. สรุปประเด็นที่ควรพิจารณาจากผลการศึกษา PPA ของกลุ่มมหาวิทยาลัยเยล

1. กลุ่มที่พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างการใช้ PPA กับการเกิดเลือดออกในสมองมีเพียงกลุ่มเดียวคือกลุ่มสตรีที่ใช้ PPA เป็นยาลดความอยากอาหาร ส่วนกลุ่มสตรีที่ใช้ PPA เป็นยาแก้หวัดคัดจมูก และกลุ่มเพศชายทั้งหมด ไม่มีความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญ

2. การใช้ PPA เป็นยาลดความอยากอาหาร มักจะใช้ขนาดสูงกว่าการใช้เป็นยาแก้หวัดคัดจมูก ประมาณ 3-5 เท่า คือใช้ขนาดมากกว่า 75 มก. ต่อวัน

3. แม้พิจารณาเฉพาะความหมายของกลุ่มที่แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ยังมีข้อโต้แย้งอยู่มากกว่าข้อมูลนี้ น่าเชื่อถือเพียงใด

3.1 เช่นการมีภาวะลำเอียง (bias) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้หลายขั้นตอน(แม้ว่ากลุ่มผู้ศึกษาจะพยายามป้องกันแล้ว) เช่น การคัดเลือกผู้ป่วย การได้มาซึ่งผู้ป่วย การตัดผู้ป่วย

ออก การตรวจสอบว่าใช้ PPA จริง คือจำได้จริง การสัมภาษณ์กลุ่มผู้ป่วยกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผู้สัมภาษณ์รู้ว่าใครเป็นกลุ่มใด การยืนยันข้อมูลจากการสัมภาษณ์ทางโทรศัพท์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีปัญหาทางสมอง

3.2 การมีปัจจัยตัวกวน (confounding factors) ซึ่งไม่สามารถควบคุมได้อย่างเหมาะสม (ซึ่งกลุ่มผู้ศึกษาอ้างว่าควบคุมแล้ว แต่ยังพบว่ามีความแตกต่างกันอยู่มากระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุม) เช่น มีข้อมูลที่เห็นได้ชัดเจนว่ากลุ่มผู้ป่วยมีกลุ่มคนผิวดำมากกว่า การศึกษาต่ำกว่า เศรษฐฐานะต่ำกว่า สูบบุหรี่มากกว่า มีประวัติความดันโลหิตสูงมากกว่า มีประวัติครอบครัวที่มีเลือดออกในสมองมากกว่า ต่อมสุรามากกว่า ใช้โคเคนมากกว่า และใช้ยาที่มีคาเฟอีนหรือนิโคตินมากกว่า เป็นต้น ซึ่งปัจจัยตัวกวนทุกปัจจัยเหล่านี้ ล้วนมีข้อมูลว่ามีผลเพิ่มอัตราการเกิดปัญหาโรคระบบหลอดเลือดทั้งสิ้น

3.3 วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติอาจไม่เหมาะสม เช่น

3.3.1 ค่าสถิติของรายงานกลุ่มเดียวกันนี้ 2 ครั้ง (May 10, 2000 และ December 21, 2000) มีบางจุดที่มีค่าไม่เท่ากัน ทั้งที่เป็นข้อมูลเดียวกัน

3.3.2 กลุ่มที่ใช้ PPA (exposure group) ในกลุ่มที่แสดงว่ามีนัยสำคัญ (ดูข้อ 1) มีจำนวนน้อยเกินไป (6 คนในกลุ่มผู้ป่วย และ 1 คนในกลุ่มควบคุม) อาจไม่สามารถทำซ้ำได้ผลเช่นเดียวกันในประชากรกลุ่มอื่น

3.3.3 การวิเคราะห์ในกลุ่มรวม (มิใช่แยกวิเคราะห์กลุ่มย่อย) เป็นข้อมูลที่เชื่อถือได้มากกว่า (ซึ่งพบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ)

3.3.4 การปรับค่า odds ratio (adjusted) น่าจะเป็นการปรับลดปัจจัยที่อาจเกิดจากตัวกวนต่างๆ (ดูข้อ 3.2) ซึ่งเมื่อตัดปัจจัยเหล่านั้นออกไปแล้ว น่าจะได้ค่าที่ลดลง แต่รายงานของกลุ่มนี้ (ฉบับ May 10, 2000) แสดงค่าที่ปรับแล้วกลับเพิ่มขึ้น

3.4 ในการพิจารณารายงานทางวิทยาศาสตร์การแพทย์นั้น หากเห็นว่าวิธีการศึกษาสามารถลดภาวะลำเอียงได้ สามารถกำจัดปัจจัยตัวกวนได้ วิเคราะห์ทางสถิติถูกต้อง และพบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติแล้ว ยังต้องพิจารณาด้วยว่ามีเหตุผลคือมีกลไกที่เป็นไปได้ (biologically plausible) หรือไม่ หากเป็นเรื่องที่หาเหตุผลอธิบายไม่ได้ ความน่าเชื่อถือก็จะน้อย ในกรณี PPA นี้ กลไกที่เป็นไปได้ยังไม่ชัดเจนว่าเกิดอะไรขึ้นที่นำไปสู่ภาวะเลือดออกในสมอง PPA มีผลเพิ่มความดันเลือดได้ แต่ไม่มากนัก และในขนาดที่ใช้โดยทั่วไปมีผลเพิ่มความดันเลือดเพียง 1-2 มม.ปรอท ซึ่งไม่มีนัยสำคัญทางคลินิก (JAMA 1989; 261:3267-72) จึงยังไม่น่าเชื่อว่าจะเกิดภาวะเลือดออกในสมองจากกลไกการเพิ่มความดันเลือด ปัญหาที่ว่ากลไกที่มีเหตุผลดีพอคืออะไร ข้อเท็จจริงที่ควรพิจารณาในเรื่องนี้มีอีกหลายประเด็น เช่น

3.4.1 ยาที่ทำให้หลอดเลือดบีบตัว ถ้าใช้เกินขนาดก็มีผลให้หลอดเลือดในสมองตีบ (ischemic stroke) มากกว่าเลือดออกในสมอง (hemorrhagic stroke)

3.4.2 ผู้ป่วย hemorrhagic stroke ส่วนใหญ่ที่กลุ่มมหาวิทยาลัยเยลรายงานเป็นชนิด subarachnoid hemorrhage ซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่ของภาวะเลือดออกในสมองแบบนี้มีได้มาจากเรื่องความดันโลหิตหรือเรื่องหลอดเลือดตีบ แต่มักเกิดจากการมีหลอดเลือดผิดปกติโป่งพองในบางจุด (aneurysm) ซึ่งไม่มีกลไกใดที่จะอธิบายได้ว่าเกิดจากยา PPA

4. โดยสรุปแล้วผลการศึกษาเรื่องอัตราเสี่ยงการเกิดเลือดออกในสมองจากการใช้ PPA โดยกลุ่มมหาวิทยาลัยเยลนี้ ยังมีข้อถกเถียงกันอยู่ในด้านวิธีการศึกษา วิธีการจัดการลำเอียง และปัจจัยตัวกวนต่างๆ วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ และความเป็นไปได้ของกลไกตามหลักวิชาการ จึงทำให้ยังมีปัญหาความน่าเชื่อถืออยู่ และควรสนับสนุนให้มีการศึกษาข้อมูลเช่นเดียวกันนี้ในกลุ่มประชากรอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคนไทย

## 2. ประเด็นการใช้ยาในประเทศไทยและรายงานผู้ป่วยภาวะเลือดออกในสมอง

1. ในสหรัฐอเมริกา มีผู้ประมาณการว่า มีการใช้ยาที่มีส่วนประกอบ PPA ประมาณปีละ 6,000 ล้าน dose (เม็ด) มีส่วนหนึ่งที่ใช้เป็นยาลดความอ้วน ในประเทศไทย ประมาณการได้ว่าน่าจะมีการใช้ยาที่มีส่วนประกอบ PPA ปีละหลายพันล้านเม็ด มีการใช้ยานี้ในลักษณะเป็นยาลดความอ้วนน้อยมาก เพราะส่วนใหญ่จะมีอัตราส่วน PPA อยู่เพียง 12.5-25 มก. ต่อเม็ด ร่วมกับยาต้านฮิสตามีน เช่นคลอเฟนิรามีน หากจะรับประทานหลายเม็ดเพื่อให้ได้ PPA ถึง 75

มก. ก็จะได้รับผลเสียของยาด้านฮิสตามีนมาก ทำให้วังมาก ปากแห้งมาก ใจสั่น ซึ่งผู้ช้ยาจะไม่สามารถช้ยาขนาดสูงนี้หลายๆ ครั้งได้ ส่วนตำรับที่เป็นยาลดความอ้วนโดยตรง แพทย์ไทยก็ได้สั่งยานี้นี้

2. จากการสอบถามผู้เชี่ยวชาญทางอายุรกรรมระบบประสาท และศัลยกรรมระบบประสาทในประเทศไทย จำนวนกว่าสิบท่าน และจากการยืนยันของผู้เชี่ยวชาญระดับนายกสมาคมฯ และราชวิทยาลัยฯ ในการประชุมทางวิชาการหลายวาระ ยังไม่มีรายงานผู้ป่วยภาวะเลือดออกในสมองที่มีหลักฐานบ่งชี้ว่าจะเกิดจากการช้ยา PPA เลย

## 3. ประเด็นการดำเนินการของ อย.

1. ผู้แทนสมาคมทางวิชาการหรือวิชาชีพ และผู้แทนสถาบันการศึกษาทางแพทย-ศาสตร์ และเภสัชศาสตร์ จำนวนมาก มีความเห็นสอดคล้องกันว่า การสรุปข้อมูลเพื่อดำเนินการเพิกถอนยา PPA เป็นการสรุปที่เกินกว่าข้อมูลที่มีอยู่จริงในรายงานการวิจัยที่อ้างถึง (ซึ่งมีข้อที่สรุปได้เพียงว่า กลุ่มสตรีที่ช้ยาที่มี PPA เป็นยาลดความอ้วนเท่านั้นที่มีอัตราเสี่ยงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ก็ไม่สามารถช้ข้อมูลนี้แสดงว่า PPA เป็นสาเหตุของการเกิดภาวะเลือดออกในสมองได้) และการนำมาบังคับช้โดยครอบคลุมการใช้ทุกอย่างในผู้ป่วยทุกกลุ่ม ทำให้มีผู้เดือดร้อนจำนวนหนึ่ง (เช่นผู้ป่วยเด็กที่จำเป็นต้องช้ยาลดอาการคัดจมูก)

2. ผู้แทนสมาคมฯ และสถาบันการศึกษาต่างๆ เห็นด้วยว่าควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาข้อมูลของประเทศไทยเกี่ยวกับการช้

ยา และปัญหาที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยา PPA คณะกรรมการการสาธารณสุข วุฒิสภา จะรับข้อเสนอแนะจากนักวิชาการส่วน

ต่าง ๆ เพื่อนำเสนอให้ อัย. พิจารณาปรับปรุงแก้ไขการดำเนินการในเรื่องนี้ต่อไป

รศ. พ.อ. ดร. บพิตร กลางกลยา

นายกสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

## PPA ยายอดฮิตส่งท้ายปีสองพัน

เรียน บรรณาธิการ

จากการที่กระทรวงสาธารณสุขได้มีประกาศเพิกถอนตำรับยาที่มี phenylpropanolamine เป็นส่วนประกอบไปเมื่อปลายปีที่แล้วนั้น เรื่องนี้มีที่มาและที่ไปไม่สมเหตุสมผลดังนี้

Phenylpropanolamine เป็นยาในกลุ่ม sympathomimetic โดยออกฤทธิ์กระตุ้น  $\alpha_1$ -adrenoceptor เป็นส่วนใหญ่ ทำให้หลอดเลือดหดตัว และกระตุ้น  $\beta_1$ -adrenoceptor ทำให้หัวใจเต้นเร็ว นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางอ้อมทำให้มีการหลั่ง nor-adrenaline จากปลายประสาท sympathetic ด้วย ในประเทศไทยใช้เป็นส่วนประกอบในยาแก้หวัดในท้องตลาดเพื่อแก้คัดจมูก (decongestant) เพราะมีฤทธิ์ที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว ทำให้ความหนาของเยื่อจมูกลดลง และการที่หลอดเลือดหดตัวยังทำให้สารน้ำซึมผ่านออกมาอยู่นอกหลอดเลือดได้น้อยลงด้วย จึงทำให้หายคัดจมูก ขนาดที่ใช้ในการรักษาคือ 25 มก. วันละ 3 ครั้ง นอกจากข้อบ่งใช้นี้ในประเทศไทยแล้ว ในต่างประเทศยังใช้เป็นยาลดความอ้วนในระยะสั้นด้วย เนื่องจากมีสูตรเคมีใกล้เคียง

กับ amphetamine จึงมีฤทธิ์ลดความอยากอาหาร

Phenylpropanolamine มีผลเสียต่อสมองน้อยกว่า ephedrine แต่มีผลเสียต่อระบบไหลเวียนเลือดและหัวใจมากกว่า pseudoephedrine ผลเสียสำคัญที่กำลังเป็นที่กล่าวขวัญกันอยู่ คือการใช้ยาในขนาดสูงกว่าขนาดรักษา คือมากกว่า 75 มก./วัน หรือให้ร่วมกับ caffeine อาจทำให้ความดันเลือดสูงได้อย่างเฉียบพลันและเกิดภาวะแทรกซ้อนจากการที่ความดันเลือดสูงตามมา<sup>1</sup> ผลเสียด้านนี้พบได้บ่อยกว่าที่เกิดจาก phenylephrine หรือ pseudoephedrine<sup>2</sup> จากรายงานที่รวบรวมผู้ป่วย 98 ราย ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1965-1989 ในทวีปอเมริกาเหนือ ซึ่งเกิดผลเสียจาก phenylpropanolamine พบผู้ที่มีผลเสียเล็กน้อย 16 ราย และมีผลเสียรุนแรง 82 ราย ใน 82 รายนี้มีเลือดออกในสมอง 24 ราย โดย 9 รายเกิดจากยาในขนาดรักษา (ตาย 1 ราย) อีก 15 รายเกิดจากยาในขนาดสูงกว่าขนาดรักษา (ตาย 5 ราย) ดังนั้นการใช้ยานี้ในขนาดที่สูงกว่าขนาดรักษา จึงมีอันตรายกว่าการใช้ในขนาดรักษามาก แต่หลังจากการตีพิมพ์เมื่อปี ค.ศ. 1990 ก็ไม่ปรากฏว่ามีคำสั่งระงับใช้ phenylpropanolamine แต่อย่างใด

Phenylpropanolamine กลับมาเป็นข่าวอีกครั้งเมื่อปลายปีที่แล้ว<sup>3</sup> เมื่อมีรายงานจากการศึกษาแบบ case control study พบว่ายานี้มีอัตราเสี่ยง (odds ratio) ของการเกิด hemorrhagic stroke เท่ากับ 16.58 (95%, CI 1.51-182.1) ในสตรีที่ใช้นานี้ลดความอ้วน และเท่ากับ 3.13 (95%, CI 0.86-11.46) ในสตรีที่ใช้นานี้เป็นครั้งแรกเพื่อแก้หวัด โดยไม่พบความเสี่ยงต่อการเกิด hemorrhagic stroke ในชาย กระทั่งวารสารสุขภาพจิตจึงมีคำสั่งให้บริษัทที่ผลิตยาขึ้นทะเบียนที่มี phenylpropanolamine เป็นส่วนประกอบ ไปแก้ไขเป็นสารอื่นให้เสร็จภายใน 180 วันหลังประกาศในราชกิจจานุเบกษา มิฉะนั้นจะถูกเพิกถอนทะเบียน ซึ่งในประเทศไทยมียาขึ้นทะเบียนที่มี phenylpropanolamine เป็นส่วนประกอบอยู่มากถึง 447 ตำรับ<sup>4</sup> ในขณะที่รายงานเรื่องการเกิดผลเสียของระบบไหลเวียนเลือดและสมอง ที่เกิดจากอาหารเสริมที่มี ephedra alkaloids เป็นส่วนประกอบ ซึ่งมี ephedrine เป็นสารสำคัญ โดยรวบรวมจากรายงานที่ส่งไปยังองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา<sup>5</sup> และลงตีพิมพ์ในวารสารฉบับเดียวกัน ซึ่งพบการเกิด stroke 10 รายจากรายงานทั้งหมด 87 ราย ตั้งแต่ 1 มิถุนายน 1997 ถึง 31 มีนาคม 1999 กลับไม่มีหน่วยงานทางราชการใดของไทยให้ความสนใจ

**เอกสารอ้างอิง**

1. Lake CR, Gallant S, Masson E, Miller P. Adverse drug effects attributed to phenylpropanolamine : a review of 142 case reports. *Am J Med* 1990; 89: 195-208.
2. Chua SS, Benrimoj SI. Non-prescription sympathomimetic agents and hyper-

ลิ่งเหล่านี้แสดงถึงความสามารถทางด้านข้อมูลข่าวสารของทางราชการไทย ไม่มีข้อมูลใดไปยืนยันหรือหักล้างข้อมูลของการอาหารและยาสหรัฐฯ จึงมีคำสั่งให้ไปไปตามการตัดสินใจขององค์การนี้ไปอย่างว่านอนสอนง่าย เช่นเดียวกันกับรัฐบาลไทยชุดที่ผ่านมา ที่ปฏิบัติตามบงการของเจ้าหน้าที่ IMF อย่างพินอบพิเทา ปราศจากการต่อรองเพื่ออธิปไตยของชาติ จนประเทศไทยต้องย่อเย็บ ตกเป็นเมืองขึ้นของสหรัฐฯ ในทางเศรษฐกิจอยู่ตราบจนเท่าทุกวันนี้ ทั้งที่แท้จริงแล้วเราควรศึกษาข้อมูลของเราเองเท่าที่พอจะสืบค้นได้ดูก่อนว่า phenylpropanolamine มีผลเสียอย่างไรที่ฝรั่งหัวแดงจาก Yale ได้รายงานไว้หรือไม่

การเป็นทาสทางเศรษฐกิจของสหรัฐฯ นั้น แม้จะเป็นเรื่องหนักหนาสาหัสที่ยินยอมเป็นโจททย์มหิมาที่รัฐบาลใหม่จะต้องเข้ามาแก้ไข แต่ยังไม่ร้ายแรงเท่ากับการเป็นทาสทางปัญญา และทาสความคิดที่ผู้มีอำนาจในการตัดสินใจของเรา กำลังถูกจองจำอยู่เลย

ผศ. นพ. ปัญญา คุณวัฒน์  
ภาควิชาเภสัชวิทยา  
คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล  
มหาวิทยาลัยมหิดล กทม. 10700

- tension. *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 1988;3:387-417.
3. Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM, et al. Phenylpropanolamine and the risk of hemorrhagic stroke. *New Engl J Med* 2000;345:1826-32.

4. See the trade names these preparations at <http://www.fda.moph.go.th>
5. Haller CA, Benowitz NL. Adverse cardiovascular and central nervous system

events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids. *New Engl J Med* 2000;343:1833-8.

#### EFFECTIVENESS OF IMIQUIMOD FOR RECURRENT GENITAL WARTS

To the editor,

Imiquimod<sup>1-3</sup> is a new pharmaceutical product presented to the physician. Imiquimod, an imidazoquinoline amine, is a new immune response modifier agent recently approved for the topical treatment of external genital and perianal warts. The dosage form of this drug is the white cream, known as Aldara. The chemical name of imiquimod is 1-(2-methylpropyl)-1H-imidazol [4,5-c] quinolin-4-amine, with the molecular formula, C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>. The molecular weight of this substance is about 240.3.

Generally it is prepared as a white to slightly yellow cream, packed in a single use foil sachet. Each sachet contains 250 mg of cream, which is enough to cover a wart area of 20 cm<sup>2</sup>. Routinely, 250 mg cream contains 12.5 mg of active ingredient, providing 5 % imiquimod cream.

The major indication of imiquimod is for external genital, perianal warts and condyloma acuminata<sup>1-3</sup>. It is used to treat the warts on surface of the penis or vulva and around the anus.

No absolute contraindication is mentioned. In this communication, the author

presents the experience in using this new drug in five immunocompetent cases of Thai patients with recurrent genital warts who failed from standard therapeutic regimen. All subjects were explained for how to use this new drug according to the manufacturer's instruction. The result from treatment was shown in Table 1.

It revealed that only 60 % of all cases got success from treatment. In these cases, recurrent could also be detected. The dermatological side effect at the lesion was the most common side effect of the imiquimod. Local erythema was the most common adverse reaction, but the majority of patients developed no side effect or only mild local inflammatory reactions. Severe skin reaction could not be observed in this series case of overdose. While myalgia and fever described as flu-like syndrome could also be observed. This systemic reaction is believed to be due to immunomodification action of the active ingredient. However, a larger prospective systematic study should be performed.

*Viroj Wiwanitkit, M.D. Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.*

Table 1. Five cases received imiquimod therapy for recurrent genital warts.

No.	Sex	Age	Sexual behavior	Clearing of lesion after start regimen (week)	Recurrent at 1 month follow up after clearing lesion	Side effect detected
1	male	47	heterosexual	12	No	Skin redness
2	male	38	heterosexual	12	No	Skin redness
3	male	45	heterosexual	16	No	Flu-like
4	male	46	heterosexual	No *	N/A**	No
5	male	37	heterosexual	No *	N/A**	No

\* means no clearing of lesion within the longest recommended duration of usage (16 weeks).

\*\*no clearing

**REFERENCES**

1. Conant MA. Immunomodulatory therapy in the management of viral infections in patients with HIV infection. *J Am Acad Dermatol* 2000 ; 43(1 Pt 2):27-30.
2. Edwards L. Imiquimod in clinical practice. *J Am Acad Dermatol* 2000 ; 43(1 Pt 2):12-7.
3. Maitland JE, Maw R. An audit of patients who have received imiquimod cream 5% for the treatment of anogenital warts. *Int J STD AIDS* 2000 Apr;11(4):268-70.

## เกร็ดน่ารู้เกี่ยวกับการวิจัยในคน

- ICH = International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use
- เป็นองค์การอิสระ ระหว่างประเทศที่ร่วมกันพัฒนามาตรฐานและข้อกำหนดต่างๆ เกี่ยวกับการวิจัยในคน
- ICH GCP = ICH Good Clinical Practice การปฏิบัติการวิจัยทางคลินิกที่ดี
- เป็นมาตรฐานสากลที่ ICH กำหนดในด้านจริยธรรมและด้านวิชาการ สำหรับการเสนอโครงการวิจัยในคน วิธีการวิจัย การกำกับดูแล การตรวจสอบ การบันทึกการวิเคราะห์และรายงานการวิจัยทางคลินิก ซึ่งให้การรับประกันว่าผลที่รายงานถูกต้อง น่าเชื่อถือ และรับประกันว่า สิทธิ บุรณภาพ รวมทั้งความลับของอาสาสมัครในการวิจัยจะได้รับการคุ้มครอง
- (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ได้แปลเอกสารนี้เป็นฉบับภาษาไทยแล้ว)
- IEC = Independent Ethics Committee
- หมายถึงคณะกรรมการอิสระของแต่ละหน่วยงาน (ควรเป็นระดับมหาวิทยาลัยหรือระดับกรมขึ้นไป) เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของโครงการวิจัยในคน ทั้งในด้านวิชาการและด้านจริยธรรม เพื่อสร้างความมั่นใจว่าสิทธิ ความปลอดภัย และความเป็นอยู่ที่ดีของอาสาสมัครที่เข้าร่วมในการวิจัยจะได้รับการคุ้มครอง และให้การรับประกันแก่สาธารณชนว่าอาสาสมัครจะได้รับการคุ้มครองจริง
  - IEC ควรประกอบด้วยกรรมการไม่น้อยกว่า 5 คน ซึ่งควรมีทั้งแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ และบุคคลอื่นที่ไม่ใช่แพทย์หรือนักวิทยาศาสตร์ เช่นนักกฎหมาย และต้องมีอย่างน้อย 1 คน ที่ไม่ใช่บุคลากรภายในสถาบันนั้นๆ
  - IEC ควรพิจารณาทั้งด้านความเหมาะสมของโครงการวิจัย ความเหมาะสมของผู้วิจัย สถานที่ทำการวิจัย ตลอดจนวิธีการรับอาสาสมัคร วิธีการคัดออก รวมทั้งเอกสารที่จะใช้ขอความยินยอมและบันทึกความยินยอมจากอาสาสมัคร

## RESEARCH ARTICLES

### NO EVIDENCE FOR THE ACTIONS OF 'CLONIDINE-DISPLACING SUBSTANCE' ON ALPHA2-ADRENOCEPTORS

Darawan Pinthong

*Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*

#### ABSTRACT

It has been suggested that 'clonidine-displacing substance' (CDS) is a putative endogenous substance at imidazoline receptor. CDS was found to recognize not only the imidazoline binding sites but also  $\alpha_2$ -adrenoceptors. However, the information of the functional activities of CDS at the  $\alpha_2$ -adrenoceptor is still limited. The aim of this study was to examine the properties and functions of CDS, in particular, the actions at  $\alpha_2$ -adrenoceptors. In the present study, the methanolic CDS extracts were prepared from bovine brain. CDS activity was determined by the amount of the extract that displaced 50% of [ $^3$ H]-clonidine binding to bovine cerebral cortex membranes. CDS activity from bovine brain methanolic extract was  $4.8 \pm 0.5$  units/g wet weight. Based on radioligand binding assays, this extract recognized both  $\alpha_2$ -adrenoceptors on bovine cerebral cortex membranes labeled by [ $^3$ H]-clonidine and non-adrenoceptor imidazoline binding sites on porcine renal cortex membranes labeled by [ $^3$ H]-idazoxan. The CDS extract was found to be slightly more potent (2 folds) at  $\alpha_2$ -adrenoceptors than at non-adrenoceptor imidazoline binding sites. Functional studies of CDS were examined in the models of  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex slices and in porcine isolated palmar lateral vein. The effects were compared to those of the known  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonists, UK14304 and antagonized by the  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, idazoxan. The results from this study showed that bovine brain methanolic CDS extract did not display any activity involving  $\alpha_2$ -adrenoceptors as predicted from radioligand binding. In conclusion, CDS is able to displace clonidine from  $\alpha_2$ -adrenoceptors but no related biological activity was detected at this sites. Whether the possibility that CDS is an endogenous ligand at  $\alpha_2$ -adrenoceptors and at non-adrenoceptor imidazoline binding sites and possesses any significant activities at these sites remain to be clarified.

**Key words :** clonidine-displacing substance (CDS), alpha2-adrenoceptor, imidazoline receptor

---

**Address correspondence and reprint requests to :** Darawan Pinthong, Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Rd., Rajthevee, Bangkok 10400, Thailand.

## Clonidine-displacing substance ไม่มีผลต่อ $\alpha_2$ -adrenoceptor

ดาราวรรณ ปิ่นทอง

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

### บทคัดย่อ

Clonidine-displacing substance (CDS) เป็นสารที่สังเคราะห์ขึ้นในร่างกายสามารถจับกับตัวรับ imidazoline และ  $\alpha_2$ -adrenoceptor เนื่องจากข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับผลของ CDS ต่อตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor ยังมีจำกัด งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติและหน้าที่ของ CDS ต่อตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัด CDS จากสมองวัวด้วย methanol ฤทธิ์ของ CDS วัดโดยปริมาณของสารสกัดที่แทนที่การจับของ [ $^3$ H]-clonidine กับเนื้อเยื่อของสมองวัวส่วน cortex ได้ 50% มีค่าเท่ากับ  $4.8 \pm 0.5$  หน่วยต่อกรัม ผลจากการศึกษาการจับของสารสกัดกับตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor ของเนื้อเยื่อสมองวัวส่วน cortex ที่ถูกจับด้วย [ $^3$ H]-clonidine และการจับของสารสกัดกับตัวรับ non-adrenoceptor imidazoline ของเนื้อเยื่อ renal cortex ของหนูที่ถูกจับด้วย [ $^3$ H]-idazoxan ด้วยวิธี radioligand binding assay พบว่าสารสกัด CDS สามารถจับกับตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor ได้มากกว่าตัวรับ non-adrenoceptor imidazoline 2 เท่า ศึกษาการทำงานของสารสกัด CDS โดยรูปแบบของการยับยั้งการสะสมของ cAMP ที่ถูกกระตุ้นด้วย forskolin ใน cerebral cortex slices ของหนูตะเภาและ isolated palmar lateral vein ของหนูที่มีกลไกผ่าน  $\alpha_2$ -adrenoceptor เปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้นกับ UK14304 ซึ่งเป็น agonist ของตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor และ idazoxan ซึ่งเป็น antagonist ของตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัด CDS จากสมองวัวด้วย methanol ไม่มีฤทธิ์ผ่าน  $\alpha_2$ -adrenoceptor โดยสรุปแล้วพบว่า CDS สามารถแทนที่ clonidine จากตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor แต่ไม่แสดงฤทธิ์ทางชีววิทยาใดๆ การศึกษาต่อไปจำเป็นต้องตรวจสอบความเป็นไปได้ของการเป็น endogenous ligand ของ CDS ที่ตัวรับ  $\alpha_2$ -adrenoceptor และ non-adrenoceptor imidazoline ตลอดจนฤทธิ์ของ CDS ต่อตัวรับดังกล่าว

คำสำคัญ : clonidine-displacing substance (CDS),  $\alpha_2$ -adrenoceptor, imidazoline receptor

## INTRODUCTION

"Clonidine-displacing substance" (CDS) was first isolated from rat and calf brains by Atlas and Burstein<sup>1,2</sup> and it was suggested to be a candidate for an endogenous ligand at non-adrenoceptor imidazoline binding site (imidazoline receptor). A partially-purified extract of the brain was found to displace specifically bound [<sup>3</sup>H]-clonidine from binding sites on rat brain or bovine cerebral cortex membranes, which were catecholamine-sensitive,  $\alpha_2$ -adrenoceptor binding sites, and hence the active agent was called clonidine-displacing substance<sup>1</sup>. CDS has been shown to interact with non-adrenoceptor imidazoline binding sites in several tissues such as brain which are defined by [<sup>3</sup>H]-*para*-aminoclonidine<sup>3</sup>, and in rabbit kidney labelled by [<sup>3</sup>H]-idazoxan<sup>4</sup>. CDS has been detected in several tissues such as brain<sup>5</sup>, kidney<sup>6</sup>, adrenal chromaffin cells<sup>7,8</sup>, liver<sup>9</sup> and lung<sup>10</sup>. However, the chemical structure of the active substance remains to be elucidated.

Although CDS has been shown to have an affinity for both  $\alpha_2$ -adrenoceptors and imidazoline binding sites, its biological activities remain unclear. At  $\alpha_2$ -adrenoceptors, CDS extract was reported to inhibit electrically-stimulated twitch responses in rat vas deferens and the inhibitory effect was partially reversed by the  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, yohimbine<sup>11</sup>. Another evidence of CDS action at  $\alpha_2$ -adrenoceptors was inhibitory adrenaline-induced aggregation but potentiating ADP-induced aggregation of human platelets, like clonidine<sup>12</sup>. However, there has been no other evidence support the action of CDS at  $\alpha_2$ -adrenoceptors since then.

For CDS action at imidazoline binding sites, CDS was found to contract rat gastric fundus strips, the site that was non-catecholamine, since this effect of CDS was not blocked by  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonists<sup>13</sup>. Brain-derived CDS extract has been reported to modulate arterial blood pressure through the non-catecholamine site when injected directly into the ventrolateral medulla<sup>14,15</sup>. However, the results examined by these 2 groups showed opposite effects, the former lowered blood pressure whereas the latter caused elevated blood pressure. Another CDS action was the induction of substantial release of catecholamines from cultured chromaffin cells<sup>7,8</sup>. Whether CDS can be a putative endogenous substance that acts at both sites, the exact biological action of CDS remains to be investigated.

The aims of this study are to examine whether the bovine brain extracts possess any agonist activities at functional  $\alpha_2$ -adrenoceptors, corresponding to their binding properties. In this study, the binding characteristics of crude methanolic CDS extracts and functional activities at  $\alpha_2$ -adrenoceptors were examined. Two  $\alpha_2$ -adrenoceptors models were used, i.e. central  $\alpha_2$ -adrenoceptors on guinea-pig cortex slices which mediate inhibition of forskolin-stimulated cyclic AMP<sup>16</sup> and  $\alpha_2$ -adrenoceptors on porcine palmar lateral veins, the activation of which results in inhibition of forskolin-stimulated cyclic AMP<sup>17</sup>.

## MATERIALS AND METHODS

### *Chemicals, drugs and solutions*

(-)-Noradrenaline bitartrate, forskolin, Dowex-50, alumina, Tris-HCl, EDTA, idazoxan (2-(2(1,4-benzodioxanyl))2-imidazoline hydrochloride) and salts in Krebs-Henseleit buffer (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and glucose) were purchased from Sigma Chemical Company. Other chemical used included cirazoline (S.M. Chemical Company), UK14304 (5-bromo-6-[2-imidazolin-2-ylamino]-quinoxaline bitartrate, Pfizer), rolipram (Schering) and HPLC grade methanol (Fisons).

[<sup>3</sup>H]-clonidine hydrochloride (specific activity of 30 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-idazoxan ([<sup>3</sup>H]-RX781094, specific activity 43 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]-adenine (specific activity 851 GBq/mmol) and [<sup>14</sup>C]-cAMP (specific activity 1.6 GBq/mmol) were from Amersham. Scintillation cocktails (Emulsifier Scintillator 299, Packard) were also included.

All drugs were dissolved in distilled water and added in volumes less than 1% of the K-H solution for cAMP assays except forskolin and rolipram which were dissolved in absolute alcohol in volumes less than 3% of assay volume and then diluted with Krebs'solution.

### *Preparation of clonidine-displacing substance (CDS) from bovine brain*

Bovine brain was obtained from a local abattoir immediately after slaughter of the animal. The brain was kept on ice during transportation. Half a bovine brain (110-160 g wet weight) was taken and the cerebellum and all pia mater removed prior to chopping into small pieces. Tissues were homogenized in an

OMNI-GEN sealed homogenizer (setting 4.5 for 3x3 min) with 5 volumes (w/v) of distilled water. The resulting homogenate was centrifuged at 65,000g for 30 min at 4°C (MSE Superspeed 65). The supernatant was then removed, boiled for approximately 40-60 min to precipitate soluble protein and to reduce the volume and then allowed to cool to room temperature. The resulting solution was recentrifuged at 65,000g at 4°C for 20 min. The supernatant was removed from pellets, frozen at -20°C and then freeze-dried. The freeze-dried material was used for further extraction. The lyophilysed material was extracted by sonication with 2x20 volume (w/v) of highly purified methanol (HPLC grade) at room temperature for 30 min. The methanolic extracts were combined and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min (MSE Mistral 3000) to remove any particulate matter and evaporated to dryness in a rotary evaporator at low pressure. The residual material was dissolved in 10 volumes (w/v) of doubled distilled water, frozen and lyophilysed again to remove all trace of organic solvent. The final lyophilysates were redissolved in 10 volumes (w/v) doubled distilled water (3 ml) and kept at -20°C until required for use.

#### *Membrane preparation*

##### *Bovine cerebral cortex membrane preparation<sup>18</sup>*

Calf brains were obtained from local abattoir immediately after slaughter of the animals. The cerebral cortices were homogenized in 20 volumes of ice-cold Tris buffer (50 mM Tris HCl; pH 7.7 at 25° C) using an OMNI-GEN sealed macro-homogenizer (Model N017506, Camlab Ltd.) (setting 5;120 sec) to minimize potential risk associated with aerosol formation. The homogenate was then centrifuged at 20,000 rpm (40,000g) for 10 min at 4° C (MSE Europa 24M). The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 20 volumes (w/v) of ice-cold Tris buffer and recentrifuged for a further 15 min and the supernatant discarded. The remaining pellets were weighed and resuspended in 6 volumes of ice-cold 50 mM Tris buffer, pH 7.4, and then aliquoted for either direct use in binding assay or stored at -20° C.

##### *Porcine kidney cortex membrane preparation*

This membrane preparation for the non-adrenoceptor imidazoline binding sites was based on the method originally described by Vigne et al.<sup>19</sup> The porcine kidney was obtained from local abattoir soon after slaughter of the animal and kept on ice prior to the dissection of the cortex. Working on ice, the kidney was cut in half and the outer membranes surrounding the kidney was stripped off and the cortex separated from the medulla. The cortex was cut into small pieces and homogenized in 24 volumes of ice-cold Tris buffer (50 mM Tris HCL, 5.0 mM EDTA; pH 7.4) using a Polytron PT (setting 6; 3x30 sec). The homogenate was then poured through a 25 µM nylon mesh to remove large particulate matter. The homogenate was centrifuged (MSE Europa 24 M) at 20,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in ice-cold Tris buffer (50 mM Tris HCL, 0.5 mM EDTA; pH 7.4) and recentrifuged for further 3 min. The final pellets were resuspended in 10 volumes of Tris assay buffer (50 mM Tris HCl; pH 7.4) and stored at -20°C.

##### *Activity of bovine brain CDS extracts*

The CDS activity of the methanolic extracts from bovine brain was evaluated by the ability of the extracts to displace 1 nM [<sup>3</sup>H]-clonidine binding from  $\alpha_2$ -adrenoceptor sites on bovine cerebral cortex membranes. The assay volume of 0.5 ml, containing 100 µl bovine cerebral cortex membrane (200-300 µg protein) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), was incubated with 1 nM [<sup>3</sup>H]-clonidine in the presence of increasing concentrations of CDS extract. Non-specific binding was determined in the presence of 10<sup>-4</sup>M noradrenaline. After an incubation period of 60 min at 25°C, bound radioactivity was separated from free by vacuum filtration over Whatman GF/B glass fiber filters using a Brandel cell harvester, followed by 2x3 ml washes with ice-cold assay buffer. The filters were then suspended in 4 ml of scintillation cocktail and bound ligands were determined by scintillation spectrometry.

One unit of CDS activity is defined as the amount of the extract that produced 50% inhibition of [<sup>3</sup>H]-clonidine (1 nM) binding to bovine cerebral cortex membranes in a total volume of 1 ml assay (assay volume was always 0.5 ml). CDS activity was calculated in unit/g wet weight of tissues. Number of units/g tissue wet weight was calculated from

the final redissolved volume with double distilled water, the number of lyophilized portions were equally divided and the original amount of tissue was used for the extraction.

***CDS extract binding to non adrenoceptor binding sites on porcine kidney cortex membranes***

Porcine kidney cortex membranes (50  $\mu$ l, approximately 200  $\mu$ g protein) were incubated with 1.0 nM [ $^3$ H]-idazoxan in the presence and absence of increasing concentrations of CDS extract, in a final volume of 0.5 ml buffer (50 mM Tris-HCl; pH 7.4 at 25°C). Non-specific binding was determined in the presence of  $10^{-4}$  M cirazoline (<15% of total binding). After 1 hr of incubation, bound radioactivity was separated from free by vacuum filtration over GF/B filters, using a Brandel cell harvester. The filters were washed with 3x3 ml of ice-cold buffer and suspended in scintillation cocktail, and the radioactivity was determined by liquid scintillation counting.

***Functional activities of CDS extract at alpha2-adrenoceptors***

***The effect of clonidine-displacing substance on forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex slices***

Male guinea-pigs (250-300 g) were killed by cervical dislocation. The cerebral cortices were dissected out on ice and chopped into miniprisms (350x350  $\mu$ m). The slices were then dispersed into oxygenated Krebs-Henseleit buffer (K-H buffer) in a stoppered conical flask with several cycles of aspiration and re-addition of medium (1 guinea-pig cortex per 100 ml flask containing 30-40 ml medium). The cortex slices were pre-incubated for 60 min in modified Krebs-Henseleit buffer in a shaking water bath at 37°C. After 1 hr equilibration, the slices were washed with K-H buffer and then were labeled with 0.4  $\mu$ M [ $^3$ H]-adenine (37 kBq/ml) for 45 min. After washing away the unincorporated [ $^3$ H]-adenine with 3 changes of K-H saline, the slices were allowed to settle. Aliquots of cortex slices (25 $\mu$ l) were distributed into flat-bottom vials containing K-H saline to maintain a final volume of 300  $\mu$ l. Basal level was the [ $^3$ H]-cAMP accumulation when incubated the slices in the K-H saline for 10 min. The forskolin-stimulated effect was the [ $^3$ H]-cAMP

accumulation when incubated the slices in K-H saline for 10 min and then incubated with 10  $\mu$ M forskolin for 10 min before termination with HCl. The effects of the methanolic extracts were compared with that of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, UK14304. The extract or UK14304 was added and incubated for 10 min before adding 30  $\mu$ M forskolin for 10 min. Incubation tubes were resealed under an O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> (95% : 5%) atmosphere after each addition. In the experiment that examined the effect of  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, idazoxan ( $10^{-6}$  M) was added 10 min before the agonist, UK14304, or CDS extracts and incubated for 10 min before the addition of forskolin (30  $\mu$ M). Incubations were terminated after 10 min by the addition of 200  $\mu$ l 1M HCl containing 25-30 Bq [ $^{14}$ C]-cAMP. Cold water (750  $\mu$ l) was added and then the slice suspension was centrifuged at 2000 g for 5-10 min.

[ $^3$ H]-cAMP was isolated by sequential Dowex50/alumina chromatography using [ $^{14}$ C]-cAMP as a recovery marker. In some experiments the effects of brain methanolic CDS extract alone (10 min incubation) were investigated. Aliquots of the supernatant (0.9 ml) were applied to Dowex50 columns (Bio-Rad, filled with 1 ml resin). Distilled water (2 ml) was added to elute [ $^3$ H] ATP and [ $^3$ H]-ADP to waste. [ $^3$ H]-cAMP was desorbed from the Dowex resin by applying 4 ml water which was allowed to drip directly onto the alumina columns. [ $^3$ H]-cAMP was eluted from the alumina columns with 5 ml 0.1 M imidazole directly into scintillation vials. Scintillation cocktail (10 ml) was added to the effluent and mixed to form a gel prior to counting in a refrigerated liquid scintillation counter, using a dual channel [ $^3$ H]/[ $^{14}$ C] program. [ $^3$ H]-cAMP levels were corrected for recovery from the Dowex/alumina chromatography and the amount of total [ $^3$ H]-adenine taken up into each individual tissue.

***The effect of clonidine-displacing substance on  $\alpha_2$ -adrenoceptor mediated inhibition of forskolin-stimulated cyclic-AMP accumulation in porcine isolated palmar lateral vein***

The presence of  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated inhibition of [ $^3$ H]-cAMP accumulation in the porcine isolated palmar lateral vein has previously been demonstrated by Wright et al, (1995)<sup>17</sup>. Porcine fore-trotters were obtained from a local abattoir and transported on ice to the laboratory. The palmar lateral vein was dissected out, placed in oxygenated, ice-cold K-H saline containing

2% Ficoll, and stored overnight at 4°C. Segments of palmar lateral vein were cut into 5 mm lengths and incubated in modified Krebs-Henseleit saline for 60 min at 37 °C in a shaking water bath. After this period of time segments of vessel were incubated with 0.8  $\mu$  M [<sup>3</sup>H]-adenine (75 KBq/ml) again for a period of 60 min at 37°C in a shaking water bath. After incubation the segments of vessel were washed 3 times by resuspension and then one segment was transferred into each flat-bottom plastic incubation vial containing Krebs solution to a final assay volume of 300  $\mu$ l. Segments were allowed to equilibrate for 20 min and all experiments were carried out in quadruplicate. The cyclic-AMP selective phosphodiesterase inhibitor, rolipram ( $10^{-5}$  M) was added to all assay tubes to prevent degradation of cAMP<sup>17</sup>. The sequence of addition of antagonist, agonist or the extracts and forskolin were the same as in the experiment with guinea-pig cortex slice as mentioned above. The  $\alpha_2$ -antagonist, idazoxan ( $10^{-6}$  M), was added 10 min before the agonist, UK14304, or CDS extracts and incubated for 10 min. Finally, forskolin (30  $\mu$ M) was added for 10 min. Incubation tubes were resealed under an O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> (95% :5%) atmosphere after each addition. Incubation was stopped by the addition of 200  $\mu$ l 1M HCl, followed by 750  $\mu$ l distilled water.

[<sup>3</sup>H]-cAMP was separated from [<sup>3</sup>H]-adenine and other [<sup>3</sup>H]-products using sequential Dowex/alumina chromatography in Dowex 50 columns (Bio-Rad), adjusting for variation in recovery by the addition of [<sup>14</sup>C]-cAMP (approximately 30 Bq per tube) as mentioned above. [<sup>3</sup>H]-cAMP and total tritium in the tissue was determined using scintillation spectrometry.

#### Data analysis

The inhibition of radioligand binding by CDS extracts was analysed using a non-linear least square method using Kaleidagraph (Synergy software) on a Mac-Intosh computer. In functional assays, the level of forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation produced by the effect of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist or antagonist or the extracts were subtracted with the basal level of cAMP production. The

results were presented as percentages of the control forskolin-stimulation above basal level.

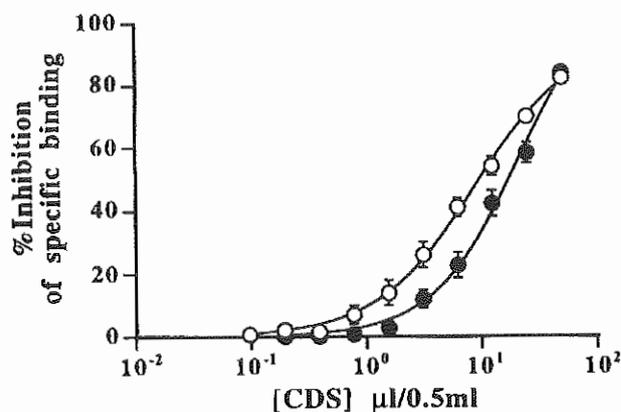
The data shown were mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) from at least 4 experiments. Statistical analysis used was the Student's t-test. The difference between mean values was considered statistically significant if  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *Binding properties of bovine brain methanolic CDS extracts*

Following aqueous extraction, deproteinization, freeze drying and further extraction with methanol, 110-160 g wet weight of bovine brain produced a slightly yellow material which was dissolved in 12 volumes of double-distilled water to yield the 'methanolic CDS extract'. As shown in figure 1, the brain CDS extract could recognize both  $\alpha_2$ -adrenoceptors and non-adrenoceptor imidazoline binding sites. The line with open circle showed that the extract caused a concentration-dependent displacement of 1 nM [<sup>3</sup>H]-clonidine binding to bovine cerebral cortex membranes which contained  $\alpha_2$ -adrenoceptor sites<sup>20</sup>. At the highest concentration examined, the brain extracts (100  $\mu$ l/ml) caused 80.5  $\pm$  2.5 % inhibition (n=8) of [<sup>3</sup>H]-clonidine binding. The amount of CDS extract producing 50% inhibition of 1 nM [<sup>3</sup>H]-clonidine binding (which was equivalent to 1 unit/ml) was 18.6  $\pm$  1.7  $\mu$ l/ml (n=8). The slope of the displacement curves was 1.09  $\pm$  0.08 (n=8). Based on the wet weight of the original starting material, the activity of CDS from bovine brain was 4.8  $\pm$  0.5 units/g wet weight (n=8 batches).

The line with closed circle showed that the extract produced a concentration-dependent displacement of [<sup>3</sup>H]-idazoxan from porcine renal cortex membranes which contained the non-adrenoceptor imidazoline binding sites<sup>19</sup>. The amount of CDS extract producing 50% inhibition of 1.0 nM [<sup>3</sup>H]-idazoxan was 33.2  $\pm$  3.4  $\mu$ l/ml (n=4). This result showed that the brain CDS extract was approximately 2 folds more potent at  $\alpha_2$ -adrenoceptors than at non-adrenoceptor imidazoline binding sites.



**Figure 1** The effect of bovine brain methanolic CDS extracts against 1nM [<sup>3</sup>H]-clonidine binding on bovine cerebral cortex membranes (O) and against 1nM [<sup>3</sup>H]-idazoxan binding on porcine renal cortex membranes (●). Non-specific binding was determined in the presence of 10<sup>-4</sup> M noradrenaline (10-15% of total binding) for the sites labeled by [<sup>3</sup>H]-clonidine and in the presence of 10<sup>-4</sup> M cirazoline (<15% of the total binding) for the sites labeled by [<sup>3</sup>H]-idazoxan. The concentration of the extract is expressed in µl/0.5 ml assay volume. The figures shown are means ± SEM from 4-8 experiments. Mean IC<sub>50</sub> (n=8) of brain extract against the site labeled by [<sup>3</sup>H]-clonidine (n=8) is significantly difference at p<0.05 from that of the site labeled by [<sup>3</sup>H]-idazoxan (n=4) (see also the text).

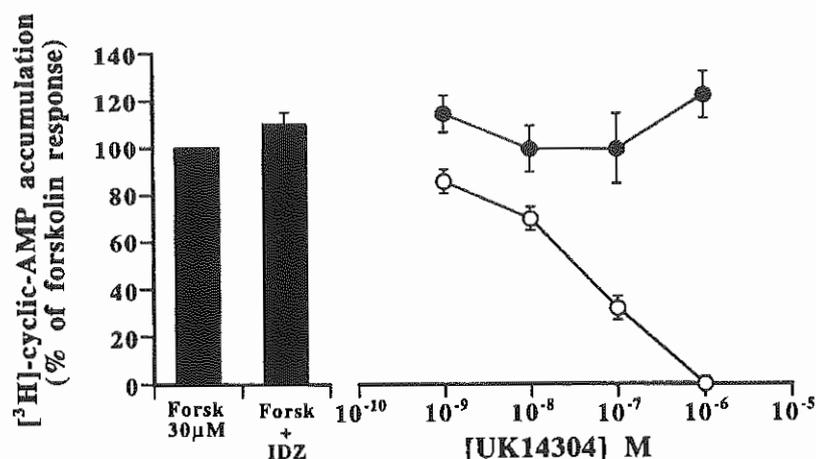
**Functional activities of CDS extracts at α<sub>2</sub>-adrenoceptors**

**The effects of α<sub>2</sub>-adrenoceptor agonist, UK14304, on forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation**

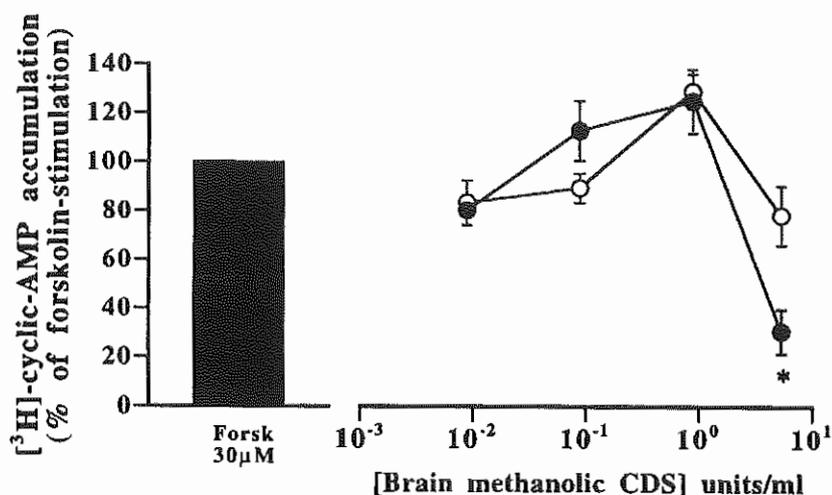
The basal level of [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex slices was 1,323 ±196 dpm (n=4). Forskolin (30 µM) caused a 3-4 folds increase in [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation, while UK14304 (10<sup>-7</sup> M) did not affect the basal levels (1,425±210 dpm, n=4). However, UK14304 caused a concentration-dependent inhibition of forskolin-stimulated cAMP accumulation, with a pD<sub>2</sub> value of 7.49±0.21 (n=4) (Figure 2). UK14304 caused complete inhibition of forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation to basal levels. The α<sub>2</sub>-adrenoceptor antagonist, idazoxan (10<sup>-6</sup> M), had no significant effects on either basal or forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP level (Figure 2, left panel) but abolished the inhibitory effect of UK14304 on forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in guinea-pig cortex slices (Figure 2, right panel). These experiments showed the presence of α<sub>2</sub>-adrenoceptors on guinea-pig cerebral cortex membranes, which were negatively linked to cAMP formation.

**The effects of brain methanolic CDS extracts on forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in guinea-pig cortex slices.**

Brain methanolic CDS extract (0.9 unit/ml) had no significant effect on basal [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation (1,485±220 dpm for basal and 1,375±385 dpm for the extract). All the concentrations of brain methanolic extracts examined (0.009-5.3 units/ml) produced no significant change (at p<0.05, n=4) in forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation. (Figure 3, right panel). The figure appeared to show a biphasic effect but these changes were not significantly different from the control forskolin response. Idazoxan (10<sup>-6</sup> M) had no significant effects on either basal (1,442±320 dpm) or forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP levels (99±4% of control response). In the presence of 10<sup>-6</sup> M idazoxan, brain methanolic CDS extract had no significant effect on forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation. Surprisingly, at a higher concentration (5.3 units/ml), in the presence of idazoxan, the extract significantly inhibited forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation to 30% of forskolin-stimulation.



**Figure 2.** The effect of UK14304 on forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex slices. The left panel (bar) shows the effect of 30 µM forskolin (Forsk) and the effect of 10<sup>-6</sup> M idazoxan (IDZ) on forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation above basal level. The right panel represents the effect of UK14304 (○) and UK14304 in the presence of 10<sup>-6</sup> M idazoxan (●) on 30 µM forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex slices. The level of [<sup>3</sup>H]-cAMP is shown as percentage of the 30 µM forskolin response (above basal level). Each experiment was carried out in quadruplicate. The values shown are means ± SEM from 4 experiments.



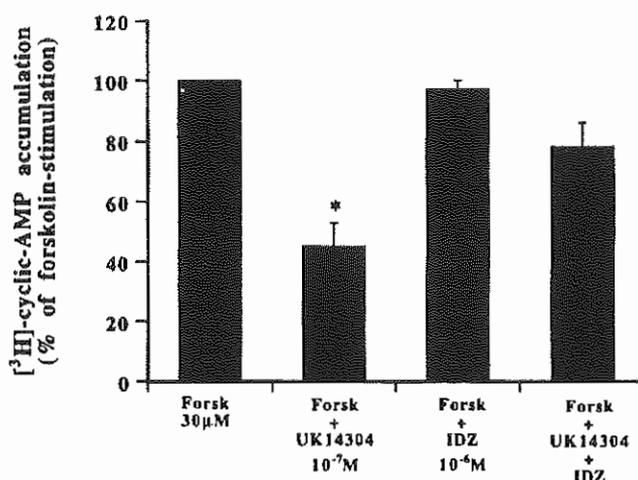
**Figure 3.** The effect of brain methanolic CDS extracts on forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex slices. The left panel (bar) shows the effect of 30 µM forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation above basal level which represents 100%. The right panel represents the effects of extract (○) and the extract in the presence of 10<sup>-6</sup> M idazoxan (●) on 30 µM forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in guinea-pig cerebral cortex slices. The level of [<sup>3</sup>H]-cAMP is shown as percentage of the 30 µM forskolin response. Each experiment was carried out in quadruplicate. The values shown are means ± SEM from 4 observations.

\* represents statistical difference from the effect of forskolin-stimulation at  $p < 0.05$ .

**The effects of UK14304 and brain methanolic CDS extracts on forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in porcine palmar lateral veins.**

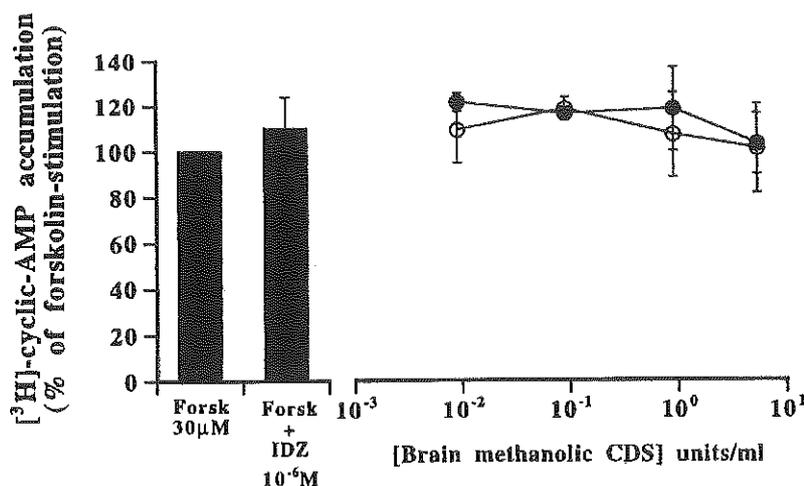
UK14304 ( $10^{-7}$  M) had no effect on the basal [ $^3$ H]-cAMP level but inhibited forskolin-stimulated [ $^3$ H]-cAMP accumulation in porcine palmar lateral veins to  $45 \pm 8$  % (n=4) of the forskolin response (Figure 4). The inhibitory effect was reduced by  $10^{-6}$  M idazoxan to  $78 \pm 9$  % (n=4). of the forskolin response.

Brain methanolic CDS extract (0.9 unit/ml) had no effect on the basal [ $^3$ H]-cAMP accumulation ( $1,008 \pm 336$  dpm for basal and  $840 \pm 168$  dpm for the response of the extract, n=4). Forskolin (30  $\mu$ M) produced an ( $19,280 \pm 2,400$  dpm) approximate 20 folds increase in [ $^3$ H]-cAMP accumulation. Figure 5 shows that the extract, over the concentration range of 0.009-5.3 units/ml, does not produce any effect on forskolin-stimulated [ $^3$ H]-cAMP accumulation, either in the presence or absence of idazoxan ( $10^{-6}$  M).



**Figure 4.** The effect of UK14304 ( $10^{-7}$  M) in the presence and absence of  $10^{-6}$  M idazoxan (IDZ) on 30  $\mu$ M forskolin (Forsk)-stimulated [ $^3$ H]-cAMP accumulation in porcine palmar lateral vein. The level of [ $^3$ H]-cAMP is shown as percentage of the 30  $\mu$ M forskolin response. Each experiment was carried out in quadruplicate. The values shown are means $\pm$ SEM from 4 experiments.

\* represents statistical difference from the effect of forskolin-stimulation at  $p < 0.05$ .



**Figure 5.** The effect of brain methanolic CDS extract on forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in porcine palmar lateral vein. The left panel (bar) shows the effect of 30 µM forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation above basal level which represents 100% and the effect of 10<sup>-6</sup> M idazoxan on forskolin response. The right panel represents the effects of the extract in the absence (O) and in the presence of 10<sup>-6</sup> M idazoxan (●) on 30 µM forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in porcine palmar lateral vein. The level of [<sup>3</sup>H]-cAMP is shown as percentage of the 30 µM forskolin response. Each experiment was carried out in quadruplicate. The values shown are means±SEM from 4 experiments. There is no significant difference (at  $p < 0.05$ ) between the effects of the extract on forskolin-stimulation and the effect of forskolin-stimulation per se.

## DISCUSSION

The present study has confirmed that methanolic extract of bovine brain contains an agent that can displace [<sup>3</sup>H]-clonidine from bovine cerebral cortex membranes. This provides the evidence for the presence of 'clonidine-displacing substance' as described by Atlas and Burstein<sup>1</sup>. The CDS extracts are also capable of interacting with the non-adrenoceptor imidazoline binding sites on porcine renal cortex membranes labeled by [<sup>3</sup>H]-idazoxan as previously reported on the properties of this substance<sup>3</sup>. This raises the possibility that CDS might be an endogenous ligand for both  $\alpha_2$ -adrenoceptors and imidazoline receptors.

The binding of the extracts exhibited some selectivity for these 2 sites as previously reported<sup>10</sup>. The brain methanolic extracts, which were prepared in the same way as in this study, were less active for opiate receptors labeled by [<sup>3</sup>H]-etorphine and inactive against  $\alpha_1$ -adrenoceptors and muscarinic binding sites

labeled by [<sup>3</sup>H]-prazosin and [<sup>3</sup>H]-quinuclidinyl benzilate, respectively. In this study, the extract was approximately 2 folds more potent at  $\alpha_2$ -adrenoceptors than at imidazoline receptors. However, this finding contrasts with that of Singh et al<sup>10</sup> which showed that the extract from bovine brain and lung were approximately 3-4 folds more active at the non-adrenoceptor imidazoline binding sites on rat kidney membranes labeled by [<sup>3</sup>H]-idazoxan than at  $\alpha_2$ -adrenoceptors on bovine cerebral cortex membranes labeled by [<sup>3</sup>H]-clonidine. This discrepancy may be due to the difference in their ligand recognition properties of porcine and rat imidazoline sites on kidneys.

In the guinea-pig cerebral cortex slice model, the imidazoline derivative  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, UK14304, was used since it produced greater effect than clonidine which showed partially agonist activity. UK14304 (10<sup>-6</sup> M) completely inhibited forskolin-stimulated cAMP accumulation.

This effect was mediated by  $\alpha_2$ -adrenoceptors since it was prevented by the  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, idazoxan. The inhibitory response to  $\alpha_2$ -adrenoceptors activation in guinea-pig cortex slices was greater than that in the rat cerebral cortex slices. In the rat model, only 35% of the forskolin-stimulated cAMP accumulation was inhibited by UK14304 ( $10^{-6}$  M)<sup>16</sup>. Because of the greater degree of inhibition seen in the guinea-pig cortex, this tissue was used to examine whether CDS extracts possessed agonist activity at central  $\alpha_2$ -adrenoceptors. This study found that methanolic CDS extract from bovine brain did not mimic the effects of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, UK14304. The unexpected significant inhibitory effect of idazoxan in combination with the higher concentration of the brain methanolic extract on forskolin response might be due to some contaminants in the methanolic extract or idazoxan that might affect adenylyl cyclase directly.

In the porcine palmar lateral vein, the vascular  $\alpha_2$ -adrenoceptors has been demonstrated to be negatively coupled to cyclic AMP formation<sup>17</sup>. The degree of inhibition by  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist,  $10^{-7}$  M UK14304, on forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation in palmar lateral vein was found to be approximately 45% of the forskolin-induced response, which was comparable to that reported by Wright et al<sup>17</sup>. The inhibitory effect of  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, UK14304, on forskolin-stimulated response in porcine palmar lateral vein was also mediated by  $\alpha_2$ -adrenoceptors, since the effect was prevented by idazoxan. However, the bovine CDS extract failed to mimic the effect of UK14304 or produce any significant potentiation of forskolin-stimulated [<sup>3</sup>H]-cAMP accumulation. In addition, idazoxan did not alter the response of the brain extract on forskolin-stimulation.

The concentration of CDS extract used in functional assays was calculated to be in the range of that produced 50% inhibition of binding, however, much higher concentration might be needed since UK14304 also needed at least 10 folds of that concentration to produce functional effects.

In conclusion, no evidence was produced for the agonist activity of CDS extracts in both central and peripheral tissues in this study. No other evidence from any groups of investigators supports the CDS effects at  $\alpha_2$ -adrenoceptors apart from the effect at prejunctional  $\alpha_2$ -adrenoceptors of the rat vas deferens<sup>11</sup> and the proaggregatory action of the human platelets<sup>12</sup>. Although CDS extracts recognize  $\alpha_2$ -adrenoceptors, the question arises whether the extracts possess any biological significance. The relation between binding characteristics and functional activities is still in doubt. In addition, different groups of investigators may determine different active compounds. Therefore, more highly purified extracts are essential in order to identify the active agents and to determine the biological activities of the same substance, and rule out the contaminants in the extract that may interfere with its functional activities.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

My deep gratitude goes to Prof. D.A. Kendall and Dr. V.G. Wilson, School of Biomedical Science, Nottingham University, UK, for their valuable comments and suggestions. Special thanks to Miss Paveena Choochuen for her help in typing this manuscript. Part of this work and the preparation of this manuscript is granted by Thai Research Fund.

#### REFERENCES

1. Atlas D, Burstein, Y. Isolation of an endogenous clonidine-displacing substance from rat brain. *FEBS Lett* 1984; 170: 387-91.
2. Atlas D, Burstein Y. Isolation and partial purification of clonidine displacing endogenous brain substance. *Eur J Biochem* 1984; 144: 287-93.
3. Ernsberger P, Meeley MP, Reis DJ. An endogenous substance with clonidine-like properties : selective binding to imidazole sites in the ventrolateral medulla. *Brain Res* 1988; 441: 309-18.
4. Copry I, Atlas D, Podevin RA, et al. Imidazoline-guanidinium receptor sites in renal proximal tubule: asymmetric distribution, regulation by cations and interaction with an endogenous clonidine displacing substance. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 252: 293-9.
5. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effect of  $\alpha$ -adrenergic drugs: differences between

- catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 230: 232-6.
6. Ernsberger P, Feinland G, Meeley MP, et al. Characterization and visualization of clonidine-sensitive imidazole sites in rat kidney which recognize clonidine-displacing substance. *Am J Hypertension* 1990; 3: 90-7.
  7. Reguanathan S, Evinger MJ, Meeley MP, et al. Effects of clonidine and other imidazole-receptors binding agents on second messenger systems and calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 2011-8.
  8. Reguanathan S, Meelen MP, Reis DJ. Clonidine-displacing substance from bovine brain binds to imidazole receptors and releases catecholamines in adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 40: 884-8.
  9. Zonneschein R, Diamant S, Atlas D. Imidazoline receptors in rat liver cells: A novel receptor of a subtype of  $\alpha$ -adrenergic receptors. *Eur J Pharmacol* 1990; 190: 203-15.
  10. Singh G, Hussain JF, MacKinnon A, et al. Further studies on crude, methanolic extracts of bovine brain and lung-evidence for the presence of a non-catecholamine, clonidine-displacing substance. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1995; 351: 17-26.
  11. Diamant S, Atlas D. An endogenous brain substance, CDS (clonidine displacing substance), inhibits the twitch response of rat vas deferens. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 134: 184-90.
  12. Diamant S, Elder A, Atlas D. A low molecular weight brain substance interacts similarly to clonidine with  $\alpha_2$ -adrenoceptors of human platelets. *Eur J Pharmacol* 1987; 144: 247-55.
  13. Feldsen D, Ernsberger P, Meeley MP, et al. Clonidine displacing substance is biologically active on smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1987; 142: 453-5.
  14. Meeley MP, Ernsberger PR, Granata AR, et al. An endogenous clonidine displacing substance from bovine brain : Receptor binding and hypotensive actions in the ventrolateral medulla. *Life Sci* 1986; 38: 1119-26.
  15. Atlas D, Diamant S, Fales HM, et al. The brain's own clonidine : Purification and characterization of endogenous clonidine displacing substance from brain. *J Cardiovas Pharmacol* 1987; 10 (suppl.12): S122-S127.
  16. Duman RS, Enna SJ. A procedure for measuring  $\alpha_2$ -adrenergic receptor mediated inhibition of cyclic AMP accumulation in rat brain slices. *Brain Res* 1986; 384: 391-4.
  17. Wright IK, Kendall DA, Wilson VG.  $\alpha_2$ -Adrenoceptor mediated inhibition of forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in the isolated porcine palmar lateral veins. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1995; 352: 113-20.
  18. Pinthong D, Wright IK, Hanmer C, et al. Agmatine recognizes  $\alpha_2$ -adrenoceptor binding sites but neither activates nor inhibits  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 1995; 351: 10-16.
  19. Vigne P, Lazdunski M, Frelin C. Guanabenz, guanochlor, guanoxan and idazoxan bind with high affinity to non-adrenergic sites in pig kidney membranes. *Eur J Pharmacol* 1989; 160: 295-8.
  20. Pinthong D, Hussain JF, Kendall DA, et al. Comparison of the interaction of agmatine and crude methanolic extracts of bovine lung and brain with  $\alpha_2$ -adrenoceptor binding sites. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 689-95.

## RELATIONSHIP OF TIME AND SERUM CONCENTRATIONS OF RUSSELL'S VIPER VENOM WITH BLOOD COAGULATING FACTORS AND RENAL HEMODYNAMICS IN ANESTHETIZED DOGS INJECTED WITH RUSSELL'S VIPER VENOM AND THE EFFECT OF DOPAMINE PLUS FUROSEMIDE

Sopit Thamaree<sup>1</sup>, Visit Sitprija<sup>2</sup>, Orawadee Harnvivatvong<sup>3</sup>, Nongnuch Thaworn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, <sup>2</sup>Queen Saovabha Memorial Institute, The Thai Red Cross Society,

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

### ABSTRACT

The relationship of time and serum concentrations of Russell's viper venom (RVV), as well as blood coagulating factors, hemodynamics, and renal hemodynamics were studied, in comparison with the administration of dopamine plus furosemide, in anesthetized male mongrel dogs (N=18), weighing 10-15 kg. Intravenous infusion of normal saline solution (NSS) containing inulin and para-aminohippuric acid (PAH) was given for renal hemodynamic studies. Twelve dogs were intramuscularly injected with RVV (0.1 mg/kg). Six of these dogs were given with RVV (0.1 mg/kg) followed by infusion of dopamine (D, 3 µg/kg/min) plus furosemide (F, a bolus dose of 1 mg/kg and infusion of 1 mg/kg/h). The other 6 dogs were injected with NSS and served as a control group. Blood and urine samples collected at time 0, 2, 6, 12 and 24 hours were analysed for inulin, PAH, electrolytes, complete blood count (CBC) and blood coagulating factors including fibrinogen, factor V, factor X and fibrin degradation product (FDP). Calculation was made to obtain renal blood flow (RBF), glomerular filtration rate (GFR), renal vascular resistance (RVR), filtration fraction (FF), fractional excretion (FE) of electrolytes. Serum concentrations of RVV, in twelve dogs given with RVV, were measured by ELISA at time 0, 15 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 9, 12 and 24 hours. The serum concentrations of RVV were plotted against time on semilog paper. Kinetic parameters were calculated from the graphs. When comparing the group given with RVV alone and the group given with RVV plus D and F, the results showed gradual absorption of RVV from the injection site into systemic circulation with time of maximum absorption ( $T_{max}$ ) of 9 hours. In both groups, maximum concentration ( $C_{max}$ ) of  $13.0 \pm 13.34$  ng/ml and  $13.0 \pm 2.83$  ng/ml, elimination half-life ( $T_{1/2}$ ) of  $26.0 \pm 18.53$  hours and  $16.4 \pm 10.96$  hours, the elimination rate constant ( $K_e$ ) of  $0.0267 \pm 0.0194$  h<sup>-1</sup> and  $0.0423 \pm 0.0211$  h<sup>-1</sup> and volume of distribution ( $V_d$ ) of  $5.56 \pm 3.23$  l/kg and  $6.06 \pm 3.85$  l/kg, were observed, respectively. Mean arterial blood pressure (MABP) was significantly decreased at time 12 and 24 hours after RVV injection, but slightly decreased in the group given with RVV+D+F. Heart rate was increased owing to sympathetic stimulation as a compensatory mechanism. In the group given with RVV, RBF, GFR, urine flow rate (V) were markedly decreased throughout the period of 24 hours of experiment whereas RVR was significantly increased. In contrast, D plus F could restore the renal function that being altered by RVV. The increase of FF and  $FE_K$  and the decrease of  $FE_{Na}$  and  $FE_{Cl}$  were not significant. Among blood components, there was no significant difference among the 3 groups. Blood cell components were slightly increased. Blood coagulating factors, including fibrinogen, factor V, and factor X, were significantly decreased where as FDP was increased throughout the experiment. Dopamine plus furosemide seemed to attenuate the effect of RVV on blood coagulation. These results indicated the failure of blood coagulation induced by RVV. The effects of RVV were closely related to serum RVV concentrations. Binding of RVV to some tissues may be responsible for high apparent  $V_d$  and long  $T_{1/2}$ , thus duration of RVV action is prolonged. Dopamine plus furosemide synergistically improved the renal functions, thus increased renal clearance of RVV. This may result in lesser effects on blood coagulation. This should be taken into an account when human victims of Russell's viper bites are treated. The conventional treatment using antivenom and maintenance of adequate volume should be monitored and observed over a longer period of time than 24 hours. Dopamine plus furosemide may considerably be useful in treatment of the viper bites.

**Key words :** serum concentration of Russell's viper venom, blood coagulating factors, dopamine, furosemide

## ความสัมพันธ์ของเวลาและความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาในซีรัมกับแฟคเตอร์เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด และการทำหน้าที่ของไตในสุนัขที่ได้รับการฉีดพิษงูแมวเซาและฤทธิ์ของโดปามีนร่วมกับฟูโรซีไมด์

โสภิต ธรรมอารี<sup>1</sup> วิศิษฐ์ ลิตปรีชา<sup>2</sup> อรวดี หาญวิวัฒน์วงศ์<sup>3</sup> นงนุช ทาวร<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาเภสัชวิทยา <sup>2</sup>สถานเสาวภา สภากาชาดไทย <sup>3</sup>ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330

### บทคัดย่อ

ศึกษาความสัมพันธ์ของเวลาและความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาในซีรัมตลอดจนแฟคเตอร์เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด การทำหน้าที่ของไต เปรียบเทียบกับการให้ยาโดปามีนและฟูโรซีไมด์ร่วมด้วยในสุนัขพันธุ์พื้นเมืองหนัก 10-15 กิโลกรัม ที่ทำให้สลบ ทำการหยดน้ำเกลือปกติที่มีอินนูลิน และกรดพาราอะมิโนฮิพพิวริก เพื่อศึกษาการทำงานของไต กลุ่มที่ 1 สุนัข 6 ตัวได้รับการฉีดพิษงูแมวเซา (0.1 มก./กก.) ทางกล้ามเนื้อ กลุ่มที่ 2 สุนัข 6 ตัวได้รับการฉีดพิษงูแมวเซา (0.1 มก./กก.) แล้วตามด้วยยาโดปามีน (3 มก./กก./นาที) ร่วมกับยาฟูโรซีไมด์ (ขนาดเดียว 1 มก./กก. ตามด้วยการหยด 1 มก./กก./ชม.) สุนัขอีก 6 ตัวได้รับการฉีดน้ำเกลือปกติเป็นกลุ่มควบคุมเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะที่เวลา 0, 2, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ระดับอินนูลิน กรดพาราอะมิโนฮิพพิวริก อิเล็กโตรไลต์ นับเม็ดเลือด วิเคราะห์ระดับแฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ไฟบริโนเจน แฟคเตอร์ห้า แฟคเตอร์สิบ และผลิตผลจากการสลายตัวของไฟบริน ค่าขนาดค่าการไหลเวียนของเลือดไปยังไต อัตราการกรองที่โกลเมอรูลัส ความต้านทานในหลอดเลือดที่ไต สัดส่วนการกรอง สัดส่วนการขับถ่ายอิเล็กโตรไลต์ วิเคราะห์หาความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาในซีรัมของสุนัข 12 ตัวที่ได้รับการฉีดพิษงูแมวเซาที่เวลา 0, 15 นาที, 30 นาที, 1, 2, 4, 6, 9, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยวิธีอิลูซา สร้างกราฟระหว่างเวลากับลือกความเข้มข้นของพิษงูแมวเซาในซีรัม ค่าขนาดค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์จากกราฟ เมื่อเปรียบเทียบกับสุนัขกลุ่มที่ได้รับพิษงูแมวเซาอย่างเดียวกับสุนัขกลุ่มที่ได้รับพิษงูแมวเซาร่วมกับยาโดปามีนและฟูโรซีไมด์ ผลการทดลองแสดงว่าพิษงูแมวเซาค่อย ๆ ถูกดูดซึมจากตำแหน่งที่ฉีดเข้าสู่กระแสโลหิต เวลาที่ระดับพิษงูแมวเซาสูงที่สุดในซีรัมคือ 9 ชั่วโมงในทั้งสองกลุ่ม ความเข้มข้นสูงสุดพอ ๆ กัน คือ  $13.0 \pm 13.34$  นนก./มล. และ  $13.0 \pm 2.83$  นนก./มล. ค่าครึ่งชีวิตของการกำจัดเท่ากับ  $26.0 \pm 18.53$  ชั่วโมงและ  $16.4 \pm 10.96$  ชั่วโมง ค่าคงที่ของการกำจัดเท่ากับ  $0.0267 \pm 0.0194$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> และ  $0.0423 \pm 0.0211$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> และปริมาตรการกระจายเท่ากับ  $5.56 \pm 3.23$  ล./กก. และ  $6.06 \pm 3.85$  ล./กก. ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของความดันเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดพิษงูแมวเซาแต่ลดลงเล็กน้อยในกลุ่มที่ได้รับพิษงูแมวเซาร่วมกับโดปามีนและฟูโรซีไมด์ อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติก ซึ่งเป็นกลไกเพื่อชดเชยการลดความดันเลือด ในกลุ่มที่ได้รับพิษงูแมวเซาอย่างเดียวยังมีการไหลเวียนของเลือด อัตราการกรองที่โกลเมอรูลัสและอัตราการไหลของปัสสาวะลดลงอย่างเด่นชัดตลอดระยะเวลาการศึกษา 24 ชั่วโมง ขณะที่ความต้านทานในหลอดเลือดที่ไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้ามยาโดปามีนและฟูโรซีไมด์สามารถทำให้การทำงานของไตที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากผลของพิษงูแมวเซากลับคืนมา การเพิ่มสัดส่วนการกรองและสัดส่วนการขับถ่ายไปเดสซีเอ็มและการลดลงของสัดส่วนการกรองและสัดส่วนการขับถ่ายโซเดียมและคลอไรด์ไม่มีนัยสำคัญ ในบรรดาส่วนประกอบของเลือดพบว่ามีความแตกต่างระหว่างสุนัข 3 กลุ่มอย่างไม่มีนัยสำคัญ เม็ดเลือดชนิดต่างๆเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดได้แก่ไฟบริโนเจน แฟคเตอร์ห้า และแฟคเตอร์สิบลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ผลิตผลจากการสลายตัวของไฟบรินเพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง ยาโดปามีนร่วมกับฟูโรซีไมด์ทำให้อุณหภูมิของพิษงูแมวเซาต่ออัตราการแข็งตัวของเลือดลดน้อยลง ผลการทดลองแสดงว่าพิษงูแมวเซาทำให้การแข็งตัวของเลือดบกพร่อง ฤทธิ์ของพิษงูแมวเซามีความสัมพันธ์กับระดับพิษงูแมวเซาในซีรัม พิษงูแมวเซาอาจจับกับเนื้อเยื่อทำให้มีปริมาตรการกระจายมาก และค่าครึ่งชีวิตยาวจึงทำให้อุณหภูมิของพิษงูแมวเซายาวนาน ยาโดปามีนร่วมกับฟูโรซีไมด์เสริมฤทธิ์กันช่วยให้การทำงานของไตดีขึ้นจึงเพิ่มการขับถ่ายพิษงูแมวเซา ผลนี้อาจทำให้อุณหภูมิของพิษงูแมวเซาต่อปัจจัยเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือดมีน้อยลง ผลการศึกษาสมควรนำมาพิจารณาเมื่อทำการรักษาคนที่ถูกงูแมวเซากัด วิธีการรักษาตั้งเดิมที่ใช้สารต้านพิษงู (แอนติเวโนม) และควบคุมให้มีปริมาตรเลือดเพียงพอ นอกจากนี้ควรเฝ้าระวังและสังเกตอาการในช่วงเวลาที่นานกว่า 24 ชั่วโมง อาจนำยาโดปามีนร่วมกับฟูโรซีไมด์มาใช้ประโยชน์ในการรักษาการถูกงูแมวเซากัดได้

คำสำคัญ : ระดับพิษงูแมวเซาในซีรัม โดปามีน ฟูโรซีไมด์ แฟคเตอร์เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด

## INTRODUCTION

The venom of snake is a complex mixture of enzymes, peptides and proteins of low relative molecular weight with specific chemical and biological activities which may cause multifarious clinical manifestation. Russell's viper venom (RVV) contains isoenzymes of phospholipase A<sub>2</sub><sup>1</sup>, coagulation factor-activating proteases<sup>2</sup>, hyaluronidase<sup>3</sup>, nuclease, hemorrhagins, and several other constituents<sup>4</sup>, which can instantly induce hematological abnormalities and circulatory failure<sup>5</sup>. The clinical manifestations associated with most viper bite are local swelling, local necrosis, systemic symptoms, spontaneous hemorrhage, hematological effects, shock and death<sup>5-7</sup>. The kidney is one of the organ frequently involved with snake bite. Acute renal failure (ARF) is an important cause of death in Russell's viper envenomation<sup>8</sup>. The nonspecific effects of RVV leading to renal hemodynamic alterations, together with direct nephrotoxicity, favor the development of ARF. Early treatment with specific antivenom and adequate fluid administration are preferred. However, the effective dose and frequency of antivenom administration should be based on the amount of venom envenomation and the kinetics of venom distribution in the body. As the severity of poisoning are directly related to the serum venom levels. The relationship of time and venom concentrations with the blood coagulating factors and renal hemodynamics may be useful in determining the proper antivenom therapy and the period of time the patients should be closely monitored. The results from our previous report showing the synergistic effect of dopamine and furosemide in the model of RVV-induced nephrotoxicity<sup>9</sup>. Dopamine combined with furosemide may accelerate the urinary excretion of RVV as a consequence of renal function improvement. It is, therefore, the purpose of this study to describe the changes of serum RVV in relation to its effects on blood coagulating factors and renal hemodynamics, in comparison with the co-administration of dopamine plus furosemide, in dogs injected intramuscularly with RVV.

## MATERIALS AND METHODS

Eighteen male mongrel dogs, weighing 10-15 kg, were studied. They were anesthetized with intravenous pentobarbital sodium (25 mg/kg). If necessary, supplementary doses of 25-50 mg were given

to maintain the anesthetized state throughout the study. In all dogs, femoral artery and vein cannulations were made for measuring the mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), blood collection, intravenous infusion of normal saline solution (NSS) and drug solution, and renal clearance study. The urine flow rate (V) was made by mean of ureter cannulation. Russell's viper venom in the lyophilized form was produced by the Queen Saovabha Memorial Institute of the Thai Red Cross Society.

### *Experimental Design*

Dogs were divided into three groups of six dogs each. In all dogs, 1.2% of para-aminohippurate (PAH) and 7.5% of inulin dissolved in NSS were intravenously injected at the dose of 0.5 ml/kg and then 0.12% of PAH and 0.75% of inulin dissolved in NSS were continuously infused with the rate of 1.8 ml/min throughout the study. After a control period of 60 min, RVV (0.1 mg/kg body weight) dissolved in 2 ml of the NSS was intramuscularly injected into twelve dogs. In six dogs given with RVV, a bolus dose of furosemide (1 mg/kg) was intravenously injected followed by continuous infusion of furosemide (1 mg/kg/h) and dopamine (3 µg/kg/min), dissolved in NSS, for 5 hours. Blood samples were taken at time 0,15,30 min, 1,2,4,6,9,12, and 24 hour. Serum was separated and quantitative analysis of RVV in the serum were performed by the method of Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) developed in-house. At time 0,2,6,12 and 24 hour, determination were made of MAP, HR, renal blood flow (RBF), glomerular filtration rate (GFR), urine flow rate (V), renal vascular resistance (RVR), filtration fraction (FF), fractional excretion of sodium (FE<sub>Na</sub>); potassium (FF<sub>K</sub>); and chloride (FE<sub>Cl</sub>). The renal plasma flow (RPF) and GFR were measured by PAH and inulin clearances, using the standard techniques<sup>10,11</sup>. Plasma and urine concentrations of inulin and PAH were measured by method described by Davidson and Sackner<sup>12</sup>, and Smith<sup>11</sup>. RBF was calculated from RPF and packed cell volume (PCV). RVR was calculated from MAP and RBF. Sodium and potassium were measured by flame photometry (Klina Flame, Beckman). Chloride was measured by a chloride analyzer (Instrumentation Labs, model 279). Blood coagulation study including complete blood count (CBC), fibrin degradation product (FDP), fibrinogen, factor V, and factor X were

performed. CBC was measured (Sysmex Meditop, Japan), FDP was measured by Rapid Latex Test<sup>13,14</sup>, fibrinogen and factor V were measured by Clotting Assay<sup>15,16</sup>, and factor X was measured by Chromigenic Assay<sup>17</sup>.

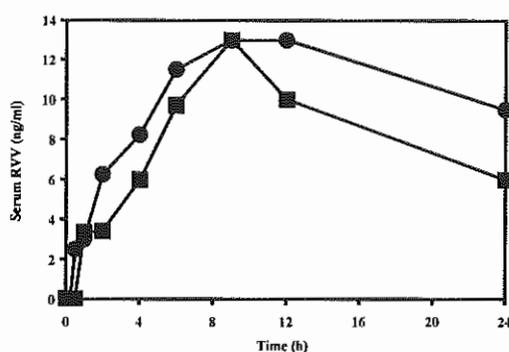
### STATISTICAL ANALYSIS

All values were expressed as mean  $\pm$  SD. The data were analyzed by Student's paired t-test. A P-value of  $<0.05$  was considered significant.

### RESULTS

#### *Serum concentrations of RVV in relation to time*

Figure 1 and Table 1 show the changes of serum concentrations of RVV during 24 hours in dogs injected with RVV (0.1 mg/kg body weight) intramuscularly, compared to the dogs injected with RVV at the same dose and same route combined with dopamine and furosemide. The levels of RVV gradually increased in both groups with the maximum concentration ( $C_{max}$ ) of 13 ng/ml at 9 hours ( $T_{max}$ ) after RVV injection. In RVV group, serum RVV was higher than that observed in the group given RVV with D+F. Moreover,  $C_{max}$  in the RVV group was sustained for at least 3 hours of observation,



**Figure 1.** Time-serum concentration curves of RVV in dogs injected with 0.1 mg RVV/kg body weight (●) and dogs given sustained RVV and dopamine combined with furose-mide (■)

whereas  $C_{max}$  in the RVV+D+F group declined to 10 ng/ml within 3 hours. At the end of 24 hours of observation, serum RVV in the group given RVV+D+F was lower than that observed in the RVV group. However, the concentrations of RVV were still high showing that RVV was slowly eliminated. Assume that the kinetics of RVV follows the one-compartment model, calculated values of kinetic parameters are shown in table 2. As elimination of RVV in the group given RVV+D+F was accelerated as considered from elimination rate constant ( $K_e$ ) and clearance (CL). Half-life ( $T_{1/2}$ ) was shortened and area under the curve (AUC) was lower than that observed in the group given RVV alone.

#### *Effects of RVV on blood components and coagulating factors*

Table 3 summarizes the effects of RVV on blood components, and table 4 shows the effects of RVV on blood coagulating factors in dogs injected with RVV (0.1 mg/kg) intramuscularly, compared to the dogs injected with RVV at the same dose and same route combined with dopamine and furosemide. White blood cells (WBC) were increased in all groups, however in the groups given RVV showed higher amount of the increased WBC during the first 12 hours. Red blood cells were slightly decreased in the groups given RVV during the first 12 hours, whereas markedly decreased in the group given RVV alone as observed at the end of 24 hours. Platelets (PLT) were slightly increased at 2 hour time and then decreased toward the end of 24 hours, while those in the control group remained unchanged. Hemoglobin was substantially decreased in the group given RVV alone as observed at the end of 24 hours. Hematocrit was slightly increased at the first 2 hours, and then decreased toward the end of 24 hours, particularly in the groups given RVV. Blood clotting factors, including fibrinogen; factor V, and factor X, were significantly decreased in the group given RVV alone and markedly decreased in the group given RVV+D+F. Whereas the fibrin degradation product (FDP) was significantly increased in the groups given RVV.

**Table 1.** Serum concentrations of RVV in dogs injected with 0.1 mg RVV/kg body weight compared with the group given RVV with dopamine (D) and furosemide (F), expressed as mean  $\pm$  S.D. (N=6)

Group	Serum RVV at Time (h)									
	0	15 min	30 min	1	2	4	6	9	12	24
RVV	0	0	2.50 $\pm$ 2.00	3.00 $\pm$ 2.83	6.25 $\pm$ 3.20	8.25 $\pm$ 7.18	11.50 $\pm$ 10.30	13.00 $\pm$ 13.34	13.00 $\pm$ 12.03	9.50 $\pm$ 8.23
RVV +(D+F)	0	0	0	3.33 $\pm$ 3.77	3.40 $\pm$ 3.58	6.00 $\pm$ 4.24	9.70 $\pm$ 2.86	13.00 $\pm$ 2.83	10.00 $\pm$ 2.35	6.00 $\pm$ 5.57

**Table 2.** Estimated values of RVV kinetic parameters in dogs injected with RVV (0.1 mg/kg) compared with the dogs given RVV with D and with F. (N=6)

Group	T <sub>1/2</sub> (h)	V <sub>2</sub> (l/kg)	K <sub>e</sub> (h <sup>-1</sup> )	CL (l/h/kg)	AUC (mg-h/l)
RVV	26.00 $\pm$ 18.53	5.56 $\pm$ 3.23	0.0267 $\pm$ 0.0194	0.1485 $\pm$ 0.1073	0.6734 $\pm$ 0.4528
RVV +(D+F)	16.40 $\pm$ 10.96	6.06 $\pm$ 3.85	0.0423 $\pm$ 0.0211	0.2563 $\pm$ 0.1215	0.3902 $\pm$ 0.1083

**Table 3.** Effects of RVV on blood components: white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), platelet (PLT), hemoglobin (HGB) and hematocrit (HCT), in dogs injected with 0.1 mg RVV/kg body weight compared with the group given RVV with dopamine (D) combined and furosemide (F) and the control group. (N = 6)

Blood Components	Group	Time (h)				
		0	2	6	12	24
WBC (x 10 <sup>3</sup> cells/ $\mu$ l)	Control	4.07 $\pm$ 2.39	8.02 $\pm$ 4.71	15.37 $\pm$ 10.83	16.90 $\pm$ 10.83	15.00 $\pm$ 10.84
	RVV	4.40 $\pm$ 3.20	12.98 $\pm$ 10.79	18.54 $\pm$ 16.79	26.90 $\pm$ 23.61	7.7 $\pm$ 6.93
	RVV +(D+F)	4.64 $\pm$ 2.33	10.45 $\pm$ 6.08	16.25 $\pm$ 10.16	23.78 $\pm$ 16.40	11.46 $\pm$ 6.13
RBC (x 10 <sup>6</sup> cells/ $\mu$ l)	Control	4.95 $\pm$ 1.54	5.13 $\pm$ 1.62	5.25 $\pm$ 1.28	5.21 $\pm$ 1.55	4.51 $\pm$ 1.55
	RVV	4.88 $\pm$ 1.23	4.76 $\pm$ 0.86	4.66 $\pm$ 0.91	4.37 $\pm$ 1.43	2.06 $\pm$ 0.79
	RVV +(D+F)	4.65 $\pm$ 1.31	4.81 $\pm$ 1.04	4.87 $\pm$ 1.06	4.45 $\pm$ 1.35	3.87 $\pm$ 0.94
PLT (x10 <sup>3</sup> cells/ $\mu$ l)	Control	69.00 $\pm$ 37.67	81.33 $\pm$ 41.64	74.50 $\pm$ 58.74	68.50 $\pm$ 38.96	77.00 $\pm$ 43.66
	RVV	69.50 $\pm$ 31.45	84.50 $\pm$ 40.63	36.60 $\pm$ 14.51	41.50 $\pm$ 21.67	36.00 $\pm$ 7.07
	RVV +(D+F)	67.30 $\pm$ 41.15	78.50 $\pm$ 38.79	46.67 $\pm$ 23.79	45.53 $\pm$ 21.69	40.35 $\pm$ 18.49
HGB (g/dl)	Control	11.45 $\pm$ 3.33	12.10 $\pm$ 3.94	12.20 $\pm$ 2.95	12.08 $\pm$ 3.17	11.10 $\pm$ 4.16
	RVV	10.80 $\pm$ 2.48	10.55 $\pm$ 1.79	10.43 $\pm$ 2.04	10.0 $\pm$ 3.28	4.9 $\pm$ 1.84
	RVV +(D+F)	10.79 $\pm$ 3.16	11.08 $\pm$ 2.67	11.27 $\pm$ 3.41	10.26 $\pm$ 3.28	10.00 $\pm$ 3.01
HCT (%)	Control	33.27 $\pm$ 9.97	34.65 $\pm$ 11.11	32.60 $\pm$ 9.73	35.42 $\pm$ 9.32	32.07 $\pm$ 11.40
	RVV	32.38 $\pm$ 7.76	33.98 $\pm$ 5.25	26.54 $\pm$ 6.68	26.90 $\pm$ 10.05	17.70 $\pm$ 5.52
	RVV +(D+F)	29.25 $\pm$ 5.85	33.88 $\pm$ 2.39	27.75 $\pm$ 4.35	24.88 $\pm$ 7.47	23.25 $\pm$ 7.5

**Table 4.** Effects of RVV on blood coagulating factors in dogs injected with 0.1 mg RVV/kg body weight, compared with the group given RVV with dopamine and furosemide. (N = 6)

Blood Coagulating Factor	Group	Time (h)				
		0	2	6	12	24
Fibrinogen (mg/dl)	Control	2.25 ± 0.27	2.07 ± 0.34	2.14 ± 0.61	2.53 ± 0.95	2.57 ± 1.45
	RVV	2.28 ± 0.68	1.83 ± 0.60	0.95 ± 0.23	0.58* ± 0.26	0.24* ± 0.12
	RVV + (D+F)	2.15 ± 0.39	1.94 ± 0.52	1.38 ± 0.43	1.07 ± 0.35	0.94 ± 0.48
Factor V (mg/dl)	Control	149.2 ± 16.36	125.23 ± 26.90	118.02 ± 39.52	108.6 ± 27.69	119.67 ± 36.12
	RVV	126.67 ± 36.80	44.50 ± 32.08	16.77* ± 13.72	12.60* ± 11.50	17.77* ± 13.90
	RVV + (D+F)	120.25 ± 24.04	65.50 ± 25.60	30.95 ± 15.62	27.53* ± 10.32	31.25* ± 11.22
Factor X (mg/dl)	Control	125.80 ± 36.80	110.40 ± 42.04	101.20 ± 43.05	106.4 ± 43.33	112.33 ± 35.92
	RVV	110.50 ± 61.65	102.50 ± 38.26	56.17 ± 42.12	39.20* ± 19.26	39.67* ± 30.67
	RVV + (D+F)	110.16 ± 53.68	100.20 ± 45.50	74.90 ± 31.11	48.75 ± 20.05	50.60 ± 21.47
Fibrin Degradation Product (FDP) (mg/dl)	Control	0	0.40 ± 0.29	1.28 ± 0.89	1.21 ± 0.32	1.11 ± 0.42
	RVV	0	0.40 ± 0.29	2.80 ± 1.10	2.97 ± 1.11	54.00* ± 25.0
	RVV + (D+F)	0	0.38 ± 0.19	2.12 ± 1.05	2.26 ± 0.97	27.35* ± 11.41

\*P < 0.05, compared with the time zero within the same group

### Effects of RVV on systemic and renal hemodynamics

Table 5 summarizes the effects of RVV on MAP, BP, RBF, GFR, V, RVR, FF,  $FE_{Na}$ ,  $FE_K$ ,  $FE_{Cl}$ . There was a significant reduction in MAP in the group given RVV alone. The HR was increased in the group given RVV+D+F. RBF, GFR and V were significantly decreased in the group given RVV alone. In contrary, RBF, GFR and V were increased in the group given RVV+D+F. RVR was significantly increased in the RVV group, whereas in the RVV+D+F group, RVR was decreased. FF was slightly increased during the first 12 hours in the RVV group.  $FE_{Na}$ ,  $FE_K$  and  $FE_{Cl}$  were increased in the group given RVV+D+F.

### DISCUSSION

The serum levels of RVV in dogs given a single dose of RVV intramuscularly peaked at 9 hours after venom injection. This result is somewhat different from that observed in the envenomated rabbit<sup>18</sup> whose peak venom levels were detected between 2-4 hours after venom injection. Whereas in RVV bite victims,  $C_{max}$  was unidentifiable since the

patients must be treated immediately on arrival to the doctors. However the initial serum levels of RVV in RVV bite victims ranged from less than 10 ng/ml to 290 ng/ml<sup>18</sup>. Since RVV and/or its metabolites are excreted by the kidney<sup>18</sup>. A combination of dopamine and furosemide seemed to enhance the excretion of RVV. Although at the end of 24 hours, elimination of RVV was not completed, however the calculation of kinetic parameters were made to obtain the relative values between the two groups. As expected, clearance of RVV in dogs receiving RVV+D+F was relatively faster when compared with the dogs given RVV alone. This effect may be due to the combination of dopamine and furosemide. Furosemide is a very potent diuretic acting on the thick ascending limb of Henle's loop and inhibits  $Na^+-K^+-2Cl^-$  symporter<sup>19</sup>. Dopamine itself acts on the  $DA_1$ -dopaminergic receptors thereby giving rise to renal vasodilatation<sup>20</sup> and facilitates furosemide to the site of its action in the nephron, thus synergises the action of furosemide. The effects of a combination of dopamine and furosemide on renal hemodynamics in dogs injected with RVV has confirmed our previous report<sup>9</sup>. Dopamine plus furosemide was reported to be effective in the

**Table 5.** Effects of RVV on mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), renal hemodynamics: renal blood flow (RBF), glomerular filtration rate (GFR), urine flow rate (V), renal vascular resistance (RVR), filtration fraction (FF), fractional excretion of sodium, potassium, and chloride (FE<sub>Na</sub>, FE<sub>K</sub>, FE<sub>Cl</sub>) in dogs injected with 0.1 mg RVV/kg alone or in combination with dopamine and furosemide. (N of each group = 6)

Parameter	Group	Time (h)				
		0	2	6	12	24
MAP (mmHg)	Control	96.01 ± 36.04	106.0 ± 33.34	93.74 ± 22.47	94.4 ± 15.08	93.01 ± 20.16
	RVV	107.13 ± 23.57	108.6 ± 18.55	104.67 ± 12.5	56.73* ± 36.9	28.24** ± 10.96
	RVV + (D+F)	100.75 ± 27.18	90.42 ± 29.1	95.75 ± 29.02	91.88 ± 12.16	85.28 ± 15.68
HR (beats/min)	Control	135 ± 34	135 ± 38	139 ± 40	147 ± 39	133 ± 26
	RVV	175 ± 44	161 ± 22	149 ± 74	147 ± 70	140 ± 42
	RVV + (D+F)	158 ± 40	141 ± 37	162 ± 53	180 ± 40	179 ± 32
RBF (ml/min)	Control	198.97 ± 33.64	134.84 ± 38.48	176.37 ± 39.61	175.05 ± 39.18	221.56 ± 57.59
	RVV	162.39 ± 63.52	93.85* ± 36.16	29.08** ± 16.37	4.73** ± 5.07	9.35** ± 1.57
	RVV + (D+F)	183.34 ± 82.54	154.96 ± 28.9	264.96 ± 235.63	343.33 ± 484.85	218.8 ± 170.45
GFR (ml/min)	Control	63.11 ± 36.11	39.31 ± 34.16	57.41 ± 55.93	76.66 ± 80.31	80.08 ± 60.06
	RVV	22.57 ± 3.96	18.64 ± 5.98	4.36** ± 2.57	1.66** ± 1.92	1.49** ± 0.51
	RVV + (D+F)	22.29 ± 8.37	24.93 ± 12.18	33.03 ± 14.15	29.37 ± 10.06	32.09 ± 13.55
V (ml/min)	Control	0.82 ± 0.53	0.84 ± 0.86	1.29 ± 0.96	1.12 ± 0.77	0.88 ± 0.44
	RVV	1.77 ± 0.67	0.52 ± 0.46	0.25** ± 0.19	0.06** ± 0.04	0.12** ± 0.06
	RVV + (D+F)	1.22 ± 0.82	2.54 ± 2.67	1.94 ± 1.68	1.11 ± 0.98	1.0 ± 0.35
RVR (x1,000 dyne-sec/cm <sup>5</sup> )	Control	45.61 ± 23.19	71.64 ± 44.85	62.82 ± 47.87	58.37 ± 36.73	36.3 ± 15.07
	RVV	65.94 ± 27.14	106.56 ± 45.68	409.15* ± 211.79	2328.22** ± 30882	252.98 ± 136.41
	RVV + (D+F)	71.38 ± 75.08	49.01 ± 14.07	60.22 ± 47.24	34.95 ± 20.98	41.11 ± 21.22
FF (%)	Control	48.33 ± 29.05	43.66 ± 27.91	46.92 ± 28.72	59.16 ± 53.03	51.91 ± 28.96
	RVV	23.09 ± 5.86	31.45 ± 11.47	26.76 ± 21.89	48.79 ± 40.88	19.44 ± 1.71
	RVV + (D+F)	18.17 ± 6.91	24.64 ± 14.69	18.74 ± 10.09	12.14 ± 15.66	20.99 ± 4.36
FE <sub>Na</sub> (%)	Control	1.43 ± 1.65	1.35 ± 2.1	2.66 ± 1.64	3.28 ± 4.31	1.67 ± 1.07
	RVV	3.9 ± 1.95	1.18 ± 0.84	4.72 ± 5.26	2.84 ± 2.59	7.69 ± 4
	RVV + (D+F)	3.54 ± 0.41	8.81 ± 6.1	7.08 ± 4.73	3.31 ± 2.03	4.56 ± 3.33
FE <sub>K</sub> (%)	Control	20.69 ± 11.08	31.65 ± 24.19	26.65 ± 18.71	40.14 ± 37.29	21.31 ± 20.19
	RVV	104.64 ± 71.05	45.42 ± 14.65	79.98 ± 64.23	151.57 ± 130.2	54.98 ± 47.08
	RVV + (D+F)	28.68 ± 25.36	80.49 ± 36	84.7 ± 56.05	49.63 ± 21.14	56.57 ± 54.95
FE <sub>Cl</sub> (%)	Control	1.67 ± 1.99	3.87 ± 5.5	1.91 ± 1.47	3.85 ± 3.88	1.71 ± 1.68
	RVV	4.08 ± 2.31	1.18 ± 1.05	4.73 ± 6.35	2.41 ± 2.14	2.83 ± 2.12
	RVV + (D+F)	3.61 ± 1.41	9.17 ± 7.72	9.5 ± 6.31	3.06 ± 3.19	6.94 ± 3.36

\* P < 0.05, compared with the time zero within the same group.

† P < 0.05, compared with the other groups

treatment of oliguric acute renal failure induced by several causes<sup>21-23</sup>. RVV clearly alters renal hemodynamics. The reduction of MAP, RBF and GFR observed in this study confirms the results from our previous report<sup>24</sup>. Hemodynamic alterations in snake envenomation are believed to be the result of interactions of various vasoactive mediators<sup>25,26</sup>, some of which are vasoconstrictors, for examples: norepinephrine, angiotensin II, endothelin, thromboxane A<sub>2</sub>, which contribute to renal vasoconstriction and cause a reduction of RBF and GFR. Some are vasodilators, for examples: prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), PGE<sub>2</sub>, bradykinin and also NO, which contribute to vasodilatation and hypotension. The effects of RVV on blood coagulating factors as observed in this study show the decrease of fibrinogen as well as the factor V and factor X. This coagulopathy is the frequent consequence of viper bites<sup>6</sup>. Viperine venoms act indirectly by activating prothrombin or factor X, then intravascular coagulation occurs and the factor X is decreased. Viper venom also acts continuously on fibrinogen, producing a fibrin more susceptible to lysis and resulting in non-clotting or poorly clotting blood because of the absent or very low levels of fibrinogen whereas levels of fibrin degradation products are elevated<sup>27</sup>, abnormal bleeding may follow<sup>6</sup>. Most viper venoms, in man, act predominantly on the haemostatic system, particularly on capillary endothelium<sup>6</sup>. Locally, this causes swelling rapidly as observed at the site of RVV injection in this study. Together with hemorrhage, the exudation may consist of plasma or whole blood as observed in this study that RBC was decreased. Hemodynamic changes are very much similar to those observed in sepsis<sup>25,28</sup>. Snake bite is thus involved the inflammatory processes. It is not surprising that the WBCs, the major blood

component playing important roles in the inflammatory processes, are found increasing during the first 12 hours in the groups given RVV. However, at the end of 24 hours WBCs which are increased in the control group may reflect some inflammation resulted from the operation procedure performed in the experiments. However the increase of WBCs is prominent in the groups given RVV. The slight increase of hematocrit and blood platelets during the first 2 hours after RVV injection is similar to the previous study in dogs<sup>29</sup>. This is probably related to a reflex mechanism that causes systemic vasoconstriction and perhaps splenic contraction in response to the decrease in MAP and plasma volume<sup>30</sup>.

## CONCLUSION

In conclusion the effects of RVV on blood coagulation and renal hemodynamics were closely related to serum RVV concentrations. Binding of RVV to tissue compartment was responsible for the high apparent volume of distribution and long half-life of the venom, thus duration of RVV action is prolonged. Dopamine combined with furosemide not only improved the renal function, they might also accelerate the urinary elimination of RVV. However the conventional treatment using specific antivenom and maintenance of adequate volume should be monitored and observed over a period of longer than 24 hours.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a Rajadapiseksompoj-China Medical Board Research Grant. Miss Patcharee Leeraj kindly typed the manuscript.

## REFERENCES

1. Kasturi S, Gowda TV. Purification and characterization of a major phospholipase A<sub>2</sub> from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. *Toxicon* 1989;27:229-237.
2. Tokunaga F, Nagasawa K, Tamura S, et al. The factor V activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-V). Identification of isoproteins, RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. *J Biol Chem* 1988;263:17471-17481.
3. Pukrittayakamee S, Warrell DA, Desadorn V, et al. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon* 1988;26:629-637.
4. Warrell DA. Snake venoms in science and clinical medicine 1. Russell's viper: biology, venom and treatment of bites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:732-740.
5. Myint-Lwin, Warrell DA, Phillips RE, et al. Bites by Russell's viper (*Vipera*

- russelli siamensis) in Burma: Haemostatic, vascular and renal disturbances and response to treatment. *Lancet* 1985;ii:1259-1264.
6. Reid HA, Theakston RDG. The management of snake bite. *Bull WHO* 1985;61:885-895.
  7. Kamiguti AS, Cardoso JLC, Theakston RDG, et al. Coagulopathy and hemorrhage in human victims of Bothrops jararaca envenoming in Brazil. *Toxicon* 1991;29:961-971.
  8. Russell FE, Carison RW, Wainschel I, et al. Snake venom poisoning in the United States. *J Am Med Ass* 1975;233:341-344.
  9. Thamaree S, Sitprija V, Harnchariyakul C, et al. The synergistic effects of dopamine and furosemide on renal hemodynamics in anesthetized dogs injected with Russell's viper venom. *Thai J Pharmacol* 1999;21(2):112-120.
  10. Napathorn S, Chaiyabutr N, Buranakarl C, et al. Effects of acute arginine loading on renal systemic hemodynamics in dogs. *Nephron* 1992;60(2):220-225.
  11. Smith HW. *Principles of Renal Physiology*. New York: Oxford University Press 1960:212-213.
  12. Davidson WD, Sackner MA. Simplification of the anthrone method for the determination of inulin in clearance studies. *J Lab Clin Med* 1963 62(2):351-356.
  13. Arocha-Pinango CLA. Comparison of the TRC II and latex-particle tests for the titration of FR-antigen. *J Clin Path* 1972;25:757-761.
  14. Rutstein JE, Holahan JR, Lyons RM, et al. Rheumatoid factor interference with the latex agglutination test for fibrin degradation products. *J Lab Clin Med* 1978;92:529-535.
  15. Clauss A. Gerinnungsphysiologische schnell Methode zur Bestimmung des Fibrinogens. *Acta Haematologica* 1957;17:237-246.
  16. Ellis BC, Stansky A A quick and accurate method for the determination of fibrinogen in plasma. *J Lab Clin Med* 1961;58:477-481.
  17. Aurell L, Friberger P, Karisson G, et al. A new sensitive and highly specific chromogenic peptide substrate for factor Xa. *Thrombosis Research* 1977;11:595-609.
  18. Lwin KO, Myint AA, Pe T, et al. Russell's viper venom levels in serum of snake bite victims in Burma. *Trans R Soc Trop Med and Hyg* 1984;78: 165-168.
  19. Koenig B, Ricipito S, Kinne R. Chloride transport in the thick ascending limb of Henle's loop potassium dependence and stoichiometry of the Nace transport system in plasma membrane vesicles. *Pflugers Arch* 1983;399:173-179.20.
  20. Higgins TL, Chernow B. Pharmacotherapy of circulatory shock. *DM* 1987;133:309-361.
  21. Lindner A, Cutler RE, Coodman WG, et al. Synergism of dopamine plus furosemide in preventing acute renal failure in the dog. *Kidney Int* 1979;16:158-166.
  22. Graziani G, Cantaluppi A, Casati S, Citterio A, Scalomogna A, Aroldi A, et al. Dopamine and furosemide in oliguric acute renal failure. *Nephron* 1984;37:39-42.
  23. Lucatello A, Sturani A, Cocchi R, et al. Dopamine plus furosemide in cocaine-associated acute myoglobinuria renal failure. *Nephron* 1992;60:242-243.
  24. Thamaree S, Sitprija V, Tongvongchai S, et al. Changes in renal hemodynamics induced by Russell's viper venom: Effects of indomethacin. *Nephron* 1994;67:209-213.
  25. Thamaree S, Sitprija V, Leepipatpaiboon S, et al. Mediators and renal hemodynamics in Russell's viper envenomation. *J Nat Tox* 2000;9(1):43-48.
  26. Thamaree S, Sitprija V, Chaiyabutr N, et al. Effects of intrarenal arterial infusion of Russell's viper venom on renal hemodynamics, plasma renin activity, and plasma thromboxane B<sub>2</sub> in indomethacin plus enalapril pretreated dogs. *Chula Med J* 1999;43(3):147-157.
  27. White J, Fasset R. Acute renal failure and coagulopathy after snake bite. *Med J Aust* 1983;2:142-143.
  28. Camussi G, Ronco C, Montrucchio G, et al. Role of soluble mediators in sepsis and renal failure. *Kidney Int* 1998;53 (suppl.66): S38-S42.
  29. Chaiyabutr N, Tungthanathanich P, Roypetjra P, et al. Observations on general circulation and renal hemodynamics of experimental dogs given Russell's viper venom. *Thai J Vet Med* 1984;14:257-270.
  30. Ganong WF. Circulation, in *Review of Medical Physiology*. Appleton & Lange. A Simon & Schuster Company 17<sup>th</sup> ed 1995;473-497.

## Informed Consent

ในการวิจัยในคน ตามหลัก good clinical practice, GCP จะต้องมีเอกสารยินยอม (informed consent form) ที่อาสาสมัคร หรือผู้แทนโดยชอบด้วยกฎหมาย (ในกรณีเป็นเด็ก หรือเป็นผู้ที่ยังไม่บรรลุนิติภาวะ หรือผู้ถูกทดลองไม่สามารถตัดสินใจเองได้ เช่น โรคจิต หรือหมดสติ) จะต้องรับทราบและให้คำยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรแสดงความสมัครใจเข้าร่วมในการวิจัยนั้นๆ หลังจากที่ได้รับข้อมูลที่แจ้งเกี่ยวกับประเด็นต่างๆ ของการวิจัยโดยละเอียดแล้ว รายละเอียดที่จำเป็นต้องแจ้งให้อาสาสมัครทราบควรมีข้อต่อไปนี้.-

1. ชื่อโครงการ และจุดมุ่งหมายของการวิจัย
2. วิธีดำเนินการวิจัย วิธีการรักษาที่อาสาสมัครจะได้รับ วิธีการสุ่มเลือก และระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย
3. การตรวจต่างๆ ที่ต้องใช้ เช่น การเจาะเลือดครั้งละกี่ซีซี รวมกี่ครั้ง
4. ความเสี่ยง หรือความไม่สะดวกสบายที่อาจเกิดขึ้นแก่อาสาสมัคร(เช่นผลข้างเคียงที่อาจได้รับจากยา) และการชดเชย ในกรณีที่เกิดอันตราย หรือความเสียหายแก่อาสาสมัคร
5. ประโยชน์ที่คาดว่าอาสาสมัครจะได้รับจากการรักษา (หากคาดว่าจะไม่ก่อประโยชน์ทางคลินิกแก่อาสาสมัครก็ควรแจ้งด้วย)
6. ค่าตอบแทนและค่าใช้จ่ายสำหรับอาสาสมัคร (ถ้ามี)
7. ข้อความที่ระบุว่า การเข้าร่วมการวิจัยของอาสาสมัครเป็นไปด้วยความสมัครใจ และอาสาสมัครอาจปฏิเสธที่จะเข้าร่วม หรือถอนตัวจากการวิจัยได้ตลอดเวลา โดยไม่มีความผิด หรือสูญเสียประโยชน์ที่อาสาสมัครพึงได้รับ (เช่น ในการรักษาโรค)
8. ข้อความที่ระบุว่า ข้อมูลส่วนบุคคลของอาสาสมัครจะได้รับการเก็บรักษาเป็นความลับ และจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย
9. ข้อความที่ระบุว่า หากมีข้อมูลเพิ่มเติมที่อาจมีผลต่อการตัดสินใจเข้าร่วมโครงการวิจัย อาสาสมัครจะได้รับแจ้งข้อมูลในเวลาอันสมควร
10. ระบุบุคคล ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ ทั้งในเวลาและนอกเวลาราชการ ของเป็นผู้รับผิดชอบโครงการวิจัย ซึ่งอาสาสมัครจะสามารถติดต่อหรือแจ้งเหตุได้ตลอดเวลา

## REVIEWS

### THE MECHANISM OF AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM IN THE REGULATION OF INSULIN SECRETION

Sirintorn Yibchok-anun

*Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.*

#### ABSTRACT

The regulation of insulin secretion is important for the maintenance of normal glucose homeostasis. There are at least four major pathways of the stimulation of insulin secretion that have been defined. The first major pathway is high concentration of glucose which causes inhibition of ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) channel and then depolarization of the plasma membrane. The second pathway is the  $K_{ATP}$  channel-independent pathway of glucose action or a distal effect. The third pathway is the activation of phospholipase C- $\beta$  by pertussis toxin (PTX)-insensitive G protein, resulting in enhancement of the effect on stimulated secretion of agonists such as acetylcholine and cholecystokinin. The fourth pathway is the activation of adenylyl cyclase by  $G_s$ , thereby activation of protein kinase A (PKA). The activation of PKA causes a small increase of  $[Ca^{2+}]_i$  and a large increase of insulin secretion. The autonomic nervous system plays both positive and negative roles in the regulation of insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. Acetylcholine activates muscarinic  $M_3$  receptor subtype, which is parasympathetic nervous system, then increases insulin secretion by combined effects of activation of phospholipase C- $\beta$  and a distal effect independent of a rise of  $[Ca^{2+}]_i$ . For sympathetic nervous system, activation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors coupled to  $G_s$  enhances insulin secretion, whereas activation of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors coupled to  $G_i/G_o$  inhibits insulin secretion. The mechanisms underlying  $\alpha_2$ -adrenergic agonists inhibit insulin secretion are activation of  $K_{ATP}$  channel, inhibition of  $Ca^{2+}$ -channel, inhibition of adenylyl cyclase and others.

**Key words :** insulin, autonomic nervous system, regulation

---

Address correspondence and reprint requests to : Sirintorn Yibchok-anun, Ph.D. Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

# กลไกควบคุมการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินโดยระบบประสาทอัตโนมัติ

ศิรินทร หยิบโชคอนันต์

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กทม. 10330

## บทคัดย่อ

การควบคุมการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน มีความสำคัญยิ่งสำหรับการรักษาภาวะสมดุลของน้ำตาลในร่างกายน กลไกสำคัญที่ควบคุมการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินมีอย่างน้อย 4 กลไก คือ

1 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในกระแสเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (K<sub>ATP</sub>) ปิด ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ เกิด depolarization ของผนังเซลล์ขึ้น

2 กลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในกระแสเลือดและ K<sub>ATP</sub> channel หรือที่เรียกว่า “distal effect”

3 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเอนไซม์ phospholipase C-β โดยผ่านทาง pertussis toxin (PTX)-insensitive G protein มีผลทำให้เพิ่มฤทธิ์ของสาร agonist บางตัว เช่น acetylcholine และ cholecystokinin ในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน

4 กลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น adenylyl cyclase โดย G<sub>s</sub> ส่งผลกระตุ้น protein kinase A (PKA) ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย และกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน

ระบบประสาทอัตโนมัติมีผลทั้งในแง่กระตุ้นและยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินจาก β-cells ของตับอ่อน Acetylcholine กระตุ้นตัวรับของระบบประสาทพาราซิมพาเธติกชนิด muscarinic (M<sub>3</sub>) ส่งผลกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินได้โดยการกระตุ้นผ่านกลไก phospholipase C-β และ distal effect ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์ สำหรับระบบประสาทซิมพาเธติก กลไกการกระตุ้นผ่านทาง β<sub>2</sub>-adrenergic receptor เพิ่มการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ในขณะที่กลไกการกระตุ้นผ่านทาง α<sub>2</sub>-adrenergic receptor ยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน กลไกที่ α<sub>2</sub>-adrenergic receptor ใช้ในการยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน คือ กระตุ้นการเปิด K<sub>ATP</sub> channel ยับยั้ง Ca<sup>2+</sup> channel ยับยั้งเอนไซม์ adenylyl cyclase และอื่น ๆ

คำสำคัญ : อินซูลิน, ระบบประสาทอัตโนมัติ, การควบคุมการหลั่ง

1. Bl. glucose ↑ → K<sub>ATP</sub> ปิด → depolarizab<sub>n</sub> → ↑ insulin secretes
2. ใม่ถ.ก. bl glucose ใล: K<sub>ATP</sub> ที่รืออกริ distal eff.
3. <sup>ม.ย.น</sup> PLC-β ผ่าน PTX-insensitive Gpr → ↑ ฤทธิ์ของสาร agonist เช่น ACh, cholecystokinin → ↑ insulin secret.
4. กระตุ้น AC โดย G<sub>s</sub> → (A) PKA → ↑ Ca<sup>2+</sup> → ↑ insulin release

**INTRODUCTION**

The regulation of insulin secretion is important for the maintenance of normal glucose homeostasis. Insulin secretion from the  $\beta$ -cell is influenced by a variety of stimulatory, modulatory, and inhibitory influences<sup>1-2</sup>. The most important stimulator of insulin secretion is glucose. Also, many hormones, neurotransmitters and autacoids can stimulate or inhibit insulin secretion. Therefore, insulin secretion is thought to be regulated by the autonomic nervous system, nutrients, and peptide hormones<sup>3-4</sup>. Glucagon, glucagon-like peptide (GLP), acetylcholine and adrenergic input through the  $\beta$ -adrenergic receptor stimulate insulin secretion; whereas somatostatin, epinephrine/norepinephrine (acting predominantly through the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor in the islet), PGE<sub>2</sub>, pancreastatin, peptide YY, calcitonin gene-related peptide and galanin reduce or completely block insulin secretion. The autonomic nervous system, therefore, has both positive and negative roles in the regulation of insulin secretion from  $\beta$ -cells. All of these agonists induce or reduce insulin secretion through mechanisms dependent on GTP binding proteins (G proteins). Various inhibitors use multiple mechanisms at the cellular level to block the secretion. The regulation of the inhibition of insulin secretion is very complex<sup>5</sup>. However, some of the inhibitory mechanisms simply reverse the stimulatory mechanisms. Therefore, we should understand the mechanisms of the stimulation of insulin secretion before understanding the mechanisms of the inhibition of insulin secretion. Although the details of stimulatory mechanisms have not been fully known yet, four major pathways of the stimulation of insulin secretion have been defined<sup>6-7</sup>.

**MAJOR PATHWAYS FOR THE STIMULATION OF INSULIN SECRETION**

The first major pathway involves depolarization of the  $\beta$ -cell, resulting in increased Ca<sup>2+</sup> influx via voltage dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channels (VDCC), increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), and increased rates of exocytosis. High concentration of glucose causes inhibition of ATP-sensitive K<sup>+</sup> (K<sub>ATP</sub>) channel and then depolarization of the plasma membrane<sup>8-11</sup>.

However, some agonists such as arginine may cause depolarization of the  $\beta$ -cell by the entry of the positively charged amino acid per se, stimulates Ca<sup>2+</sup> influx through VDCC, increases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and thus triggers insulin release<sup>12</sup> without closing of K<sub>ATP</sub> channels<sup>4</sup>.

The second major pathway is the K<sub>ATP</sub> channel-independent pathway of glucose action or a distal effect. This pathway is so called a distal effect because glucose exerts its effect after the increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> or at a step distal to the generation of secondary messengers, for example protein kinase C (PKC) and adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP)<sup>13-15</sup>. Although it has been widely assumed that the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is required for glucose to exert an effect, it appears that this is not always true. Sharp et al. found that the K<sub>ATP</sub> channel-independent action of glucose stimulates insulin secretion by acting at a late stage of stimulus-secretion coupling without any requiring increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> or its expression<sup>16</sup>. This Ca<sup>2+</sup>-independent augmentation of secretion by glucose has been observed in Ca<sup>2+</sup>-depleted pancreatic islets under Ca<sup>2+</sup>-free conditions and is elicited by simultaneous activation of protein kinase A (PKA) and PKC. Little is known about this mechanism, except that it requires glucose metabolism. However, the underlying mechanism appears to be via the normal process of exocytosis because it is completely blocked by norepinephrine. Moreover, it is clear that this glucose-activated pathway is K<sub>ATP</sub> channel-independent because neither sulfonylurea (K<sub>ATP</sub> channel inhibitor) nor diazoxide (a K<sub>ATP</sub> channel activator) affects the glucose-induced augmentation of insulin release. Therefore, it seems that there are two possibilities for the K<sub>ATP</sub> channel-independent pathway. One is that glucose exerts its effect only in the presence of activated PKC or strongly in the presence of activated PKC and PKA. Hence, PKC and PKA would be permissive for the effect of glucose. Another possibility is that the simultaneous activation of PKC and PKA mimics the effect of elevated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. If this is the case, this pathway should be the same mechanism underlying the K<sub>ATP</sub> channel-independent effect of glucose that is thought to require an increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Regardless of its mechanism, this glucose-activated pathway exerts its effect at the distal site in stimulus-secretion coupling. In addition to this distal effect of glucose, other agonists have distal action to modulate insulin secretion, which

ACh - M<sub>3</sub>-R → PLC-β → (+) insulin secret<sup>+</sup>

β<sub>2</sub>-R (+)

α<sub>2</sub>-R (-) ↑ insulin secretion via K<sub>ATP</sub> channel, inh Ca<sup>2+</sup> channel, inh AC

includes carbachol<sup>17</sup>, epinephrine<sup>18</sup>, and norepinephrine<sup>19</sup>.

The third pathway is the activation of phospholipase C- $\beta$  by pertussis toxin (PTX)-insensitive G proteins, which increases phosphoinositide (PI) turnover, thereby increases production of inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG)<sup>4</sup>. IP<sub>3</sub> mobilizes Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum to increase [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub><sup>4</sup> and DAG activates PKC, enhancing the effect on stimulated secretion of agonists such as acetylcholine and cholecystokinin.

The fourth pathway is the activation of adenylyl cyclase by G<sub>s</sub>, a cholera toxin-sensitive G protein, which causes a rise in cAMP, and then activates PKA. The activation of PKA causes a small increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and a large increase of insulin secretion. These four signaling pathways are shown in figure 1. There are several mechanisms for inhibition of stimulated insulin release as well. The proximal mechanisms, include activation of the K<sub>ATP</sub> channels and consequent repolarization of the membrane, direct inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> channels, inhibition of PI hydrolysis and DAG production, and inhibition of adenylyl cyclase activity. The last pathway is the distal effect that would inhibit the final common pathway in stimulus-secretion coupling beyond the site of action of elevated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and beyond the generation of secondary messengers<sup>4</sup>. This mechanism is still not well understood. The inhibition of insulin release by norepinephrine, somatostatin, galanin and prostaglandins is blocked by treatment with PTX, suggesting that this effect is mediated by PTX-sensitive G protein-linked receptors.

#### PARASYMPATHETIC REGULATION OF INSULIN SECRETION

Islets of Langerhans are innervated by parasympathetic and sympathetic nervous systems. It is clear that autonomic activity has an important modulating effect on the insulin secretion. Stimulation of vagal nerve fibers or the administration of acetylcholine enhances insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cells. These effects are abolished by atropine, suggesting that they are mediated by muscarinic receptors. In addition, the slight but significant impairment of glucose-induced insulin secretion has been observed after vagotomy in the fasted rat<sup>20</sup>. The sight, smell and taste of food can stimulate insulin secretion through activation of parasympa-

thetic and inhibition of sympathetic nervous system<sup>21</sup>.

The subtypes of muscarinic receptor in pancreatic islets is M<sub>3</sub><sup>22</sup>. Activation of muscarinic receptors couples to G<sub>q/11</sub>, a PTX-insensitive G protein, which stimulates phospholipase C- $\beta$ . The activation of PKC may potentiate the stimulation of insulin secretion by sensitizing the secretory apparatus to Ca<sup>2+</sup>. It is clear that muscarinic receptor activation stimulates insulin secretion by the combined effects of activated phospholipase C- $\beta$  to increase DAG and to mobilize Ca<sup>2+</sup>. Since inhibition of PKC reduces or abolishes muscarinic effect on insulin secretion in islet  $\beta$ -cells<sup>23,24</sup> and in clonal hamster  $\beta$ -cell line (HIT)<sup>25</sup>. The elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and activation of PKC act in synergy to bring about the full physiological response of  $\beta$ -cells to muscarinic activation. However, Sharp et al. found that activation of muscarinic receptors of an insulin secreting clonal  $\beta$ -cell line (RINm5F) stimulated insulin secretion by the mechanism that was independent of the rise in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and independent of the activation of PKC. This suggested that the stimulation of insulin secretion by muscarinic activation in these cells is also exerted at the distal stage in stimulus-secretion coupling, a stage that is independent of a rise of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub><sup>17</sup>.

#### SYMPATHETIC REGULATION OF INSULIN SECRETION

The sympathetic nervous system plays both positive and negative roles in the regulation of insulin secretion. Both  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors have been demonstrated in pancreatic islets. Activation of  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergic receptors enhances insulin secretion, whereas activation of  $\alpha$ <sub>2</sub>-adrenergic receptors inhibits insulin secretion. For  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergic receptors, activation of these receptors couples to G<sub>s</sub>, a cholera toxin-sensitive G protein, stimulates adenylyl cyclase, thus causing an increase in cAMP and activation of PKA. The activated PKA causes a small augmentation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and a large increase of insulin secretion<sup>4</sup>. Epinephrine and norepinephrine have important influences on metabolic processes. They decrease the uptake of glucose by peripheral tissues because of the effect on insulin secretion. Stimulation of the sympathetic nervous system attenuates insulin secretion from  $\beta$ -cells, unless  $\alpha$ <sub>2</sub>-adrenergic receptors in the pancreas are blocked. Also,  $\alpha$ <sub>2</sub>-adrenergic receptor antagonists alone on both

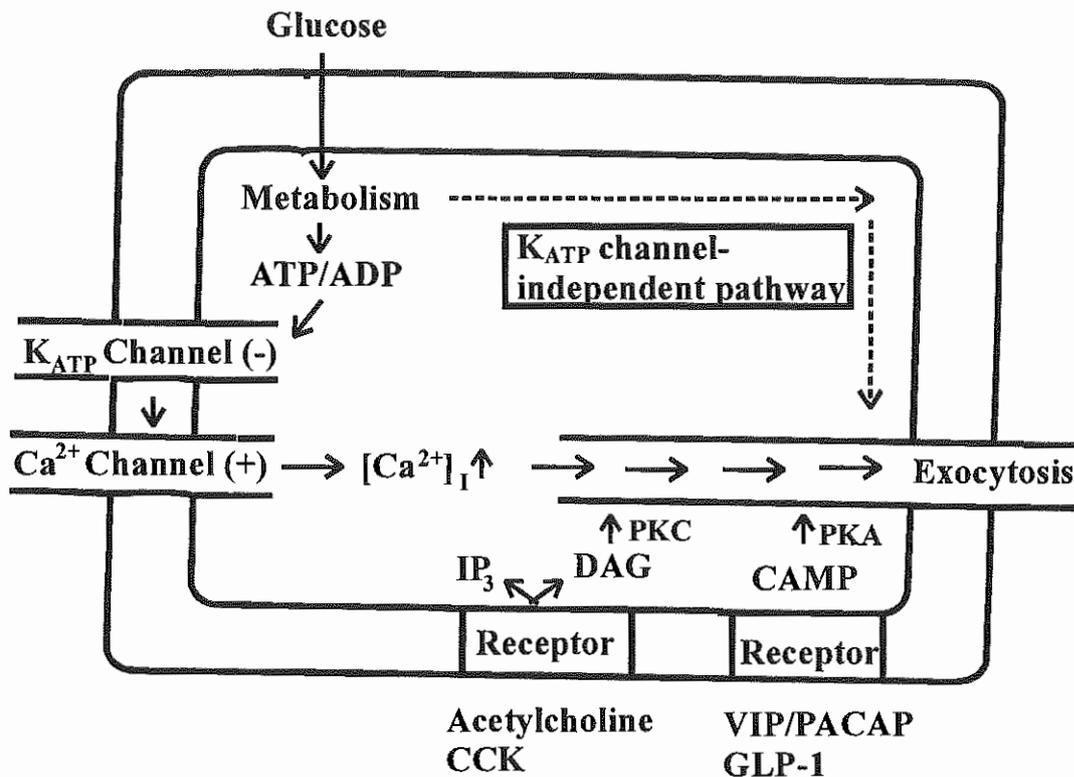


Figure 1. Four major pathways involved in stimulation of insulin release. Shown is  $K_{ATP}$  channel-dependent pathway in which increased blood glucose concentrations and consequent increased  $\beta$ -cell metabolism result in a change in intracellular ATP to ADP ratio. This is thought to be a contributory factor in closure of ATP-dependent  $K^+$  channels, depolarization of  $\beta$ -cell membrane, and increased L-type channel activity. Increased channel activity and increased  $Ca^{2+}$  influx result in increased intracellular  $Ca^{2+}$  and stimulated insulin release. Also shown is important  $K_{ATP}$  channel-independent pathway that augments  $Ca^{2+}$ -stimulated insulin release of  $K_{ATP}$  channel-dependent pathway. Major potentiation of release results from hormonal and peptidergic activation of receptors positively linked to adenylyl cyclase, for example, vasoactive intestinal peptide (VIP), pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP), and glucagon-like peptide 1 (GLP-1). Occupation of these receptors by the hormones results in activation of the enzyme, increased cAMP levels, and potentiation of release by 2 mechanisms. These are activation of protein kinase A (PKA) and phosphorylation of the L-type  $Ca^{2+}$  channel to increase  $Ca^{2+}$  entry and phosphorylation at an as yet unknown distal site in stimulus-secretion coupling to enhance stimulated release. A second potentiating mechanism is due to activation of receptors linked to phospholipase C, increased phosphoinositide hydrolysis, and increased production of inositol triphosphate ( $IP_3$ ) and diacylglycerol (DAG). As is the case for adenylyl cyclase stimulation, the 2 products of phospholipase C activity result in increased  $[Ca^{2+}]_i$  and potentiation of insulin release by protein kinase C (PKC) activation and phosphorylation of another as yet unknown distal site in stimulus secretion coupling (Modified from Sharp GWG, 1996).

$\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptors, but the increase insulin secretion. Catecholamines act predominant effect seen with epinephrine and norepinephrine on insulin secretion is inhibition. This effect has been found both in perfused pancreas and in isolated islets of Langerhans, suggesting that circulating levels of epinephrine or norepinephrine from sympathetic nerve terminals play an important role in the physiological regulation of insulin secretion<sup>19</sup>. These agonists act on  $\alpha_2$ -adrenergic receptor in  $\beta$ -cells, coupled to  $G_i/G_o$ , PTX-sensitive G proteins, leading to inhibition of insulin secretion via many mechanisms that are described as follows<sup>5</sup>.

### **K<sub>ATP</sub> CHANNEL ACTIVATION**

One  $\alpha_2$ -adrenergic mechanism is to decrease the  $\beta$ -cell membrane potential. The  $\alpha_2$ -adrenergic agonists activate the K<sub>ATP</sub> channel, hyperpolarize the membrane, and thus inhibit the insulin secretion and also inhibit the action of all secretagogues that act to depolarize the  $\beta$ -cell via the inhibition of this channel<sup>4</sup>. However, the effect of these inhibitors via this mechanism is frequently not of great magnitude and is often transient, and fails to completely reverse the depolarizing effect of glucose<sup>26,27</sup>. Therefore, the significance of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor mediated membrane repolarization in  $\beta$ -cells for the inhibition of insulin secretion is still unclear.

### **Ca<sup>2+</sup> CHANNEL INHIBITION**

The second action of  $\alpha_2$ -adrenergic agonists is the direct inhibition of voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> channels.  $\alpha_2$ -adrenergic agonists also inhibit the effect of all secretagogues that act to stimulate Ca<sup>2+</sup> influx through VDCC by closing K<sub>ATP</sub> channels.

### **INHIBITION OF ADENYLYL CYCLASE**

The third mechanism of norepinephrine/epinephrine is to inhibit the activity of adenylyl cyclase, thereby reducing cAMP levels in the pancreatic  $\beta$ -cells<sup>28,29</sup>, consequently inhibiting insulin secretion. The action of these inhibitors also decreases the effect of other secretagogues, for example glucagon and glucose, that stimulate insulin secretion via activation of adenylyl cyclase<sup>30</sup>. Inhibition of exocytosis in electrically permeabilized islets bathed with high concentration of Ca<sup>2+</sup>, norepinephrine inhibited

Ca<sup>2+</sup>-induced insulin secretion with similar efficacy to that of the inhibition of glucose-induced insulin secretion from intact islets<sup>18,19</sup>. This inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced insulin secretion from permeabilized islets was blocked by the  $\alpha_2$ -adrenergic blocker, yohimbine, but was not reversed by cyclic AMP (cAMP). Moreover, Ca<sup>2+</sup>-independent stimulation of insulin secretion by glucose, mediated via distal sites, was totally blocked by norepinephrine. It is likely that the inhibitory action of the  $\alpha_2$ -adrenergic agonist occurs late in stimulus-secretion coupling, for example, after the elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; or after the generation of secondary messengers and is referred to as the distal or late effect. This distal inhibitory action is mediated via PTX-sensitive G proteins,  $G_i/G_o$ .

Because of little information about the nature of the distal inhibitory effect, little is known about the mechanism involved in the late stages of stimulus-secretion coupling and exocytosis. However, by using the information gained in yeast and neuronal system as the basis for studies on the pancreatic exocytosis, it is now possible to see an outline of the distal steps as followings.

1. After activation of  $\beta$ -cells, the granules translocate to the plasma membrane.
2. After translocation, the granules must dock.
3. The granules are then primed.
4. The granule membrane fuses with the plasma membrane and exocytosis.

After the fourth step, the endocytosis must follow exocytosis to complete the cycle and allow exocytosis to occur again for lengthy periods. Nevertheless, there is the evidence supporting that exocytosis in the  $\beta$ -cell is analogous to that in the yeast and in the neuronal synapse, and that will be consistent with synaptosome-associated protein (SNAP) receptor (SNARE) hypothesis<sup>31-33</sup>. The complex of vesicle-associated membrane protein (VAMP; also called synaptobrevin), syntaxin, and SNAP-25 (synaptosome-associated protein of relative molecular weight 25,000) is the receptor for SNAP, the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein. The translocation step appears to involve low-molecular weight G proteins of the Rab family. Docking involves formation of a core complex including syntaxin and SNAP-25 from the plasma membrane, the target (t)-SNARE, and a VAMP/synaptobrevin, the vesicle (v)-SNARE. Synaptotagmin on the granule is a Ca<sup>2+</sup> sensor related in priming-fusion process. Finally, the

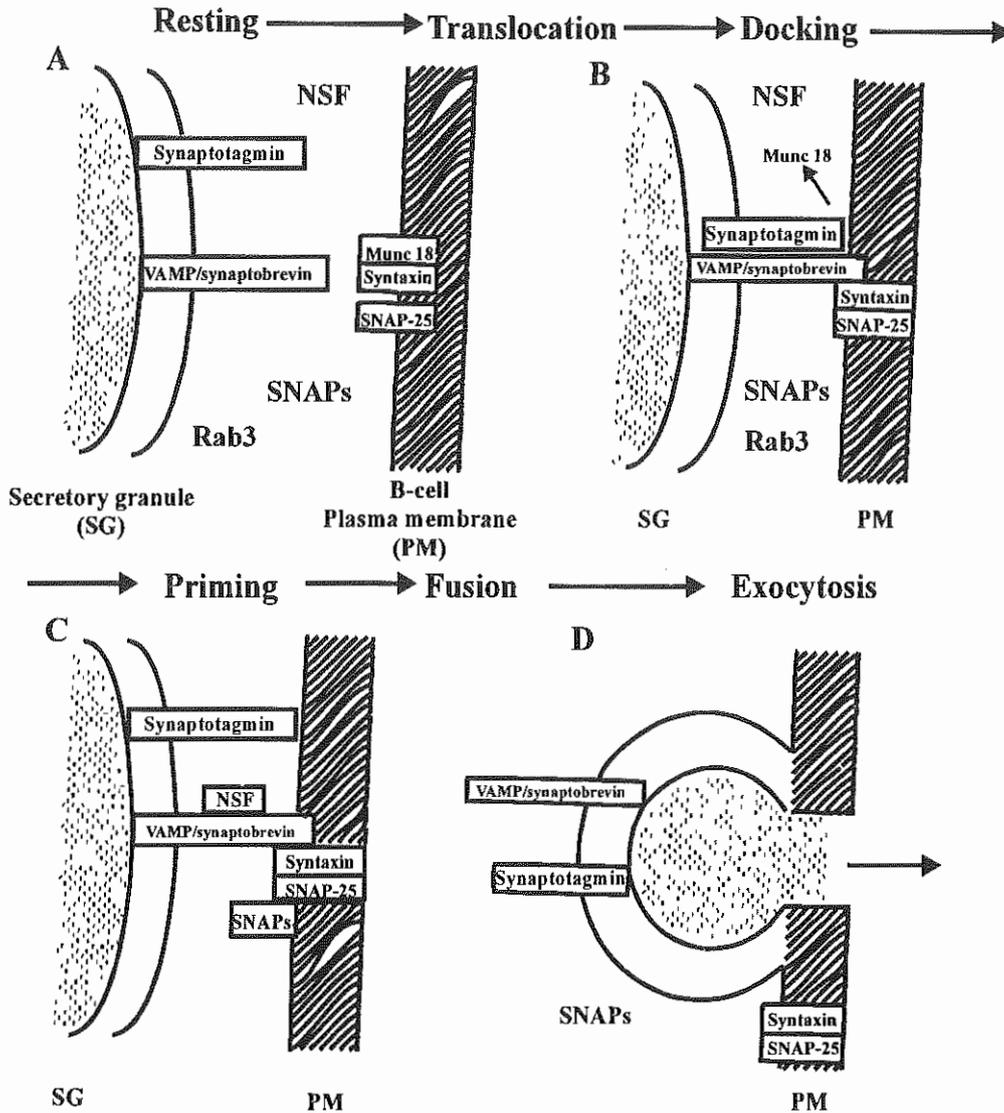


Figure 2. Scheme for distal steps in stimulus-secretion coupling and exocytosis in pancreatic  $\beta$ -cell. Shown are some of the components necessary for exocytosis and events that are thought to occur during final stages of stimulus secretion coupling and exocytosis. In basal or resting state (A, left) a secretory granule (SG) is shown in apposition to  $\beta$ -cell plasma membrane (PM). Some of the components necessary for exocytosis, which have been identified in the  $\beta$ -cell, are shown. After translocation to the PM, a process that may involve the Rab3 GTP-binding proteins, vesicle-associated membrane protein (VAMP)/synaptobrevin (the v-SNARE) in the granule membrane can bind to syntaxin and synaptosome-associated protein of relative mol. Wt. 25,000 (SNAP-25; the 2 making up the t-SNARE) in the plasma membrane (B). As the mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans unc-18* gene (Munc 18) inhibits the binding of the v- and t-SNARE, binding or docking requires the prior dissociation of Munc 18. Synaptotagmin association with the complex is also thought to be inhibitory, and dissociation of synaptotagmin from the complex is necessary so the system can be "primed". Subsequently, *N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) and soluble NSF attachment protein (SNAP) complete the formation of the fusion complex (C), which leads finally to exocytosis (D). (Modified from Sharp GWG, 1996).

completed core complex associates with NSF, SNAP, and perhaps other players to promote fusion and exocytosis.

The above information and figure 2 provide the document for illustrating the potential sites for the distal inhibitory effect. For instance, Munc 18 inhibits the binding of syntax and SNAP-25, so that the inhibitor may act to prevent the dissociation of Munc 18 at the docking stage. In addition, synaptotagmin is bound to VAMP/synaptobrevin and inhibits its action on the SNAP-25 and syntaxin complex. Therefore, any inhibitor that acts to prevent the dissociation of synaptotagmin from this complex would inhibit exocytosis. However, there are many potential targets for inhibitor's action at this stage, so that further studies in this area are warranted<sup>4</sup>.

#### OTHER POSSIBLE MECHANISMS

Norepinephrine and epinephrine may inhibit insulin secretion from the pancreatic  $\beta$ -cells via other possible mechanisms, such as inhibition of glucose metabolism, activation of sulfonylurea-insensitive low-conductance  $K^+$  channels, inhibition of fatty acid metabolism, elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and increase in F-actin content<sup>4</sup>. Actin microfilaments inhibit the access of secretory granules to the plasma membrane before exocytosis. Norepinephrine increases F-actin contents, thereby causing the exocytosis more difficult to occur.

In addition, epinephrine may have an inhibitory action on insulin synthesis. Zhang et al found that epinephrine not only decreased insulin secretion but also decreased levels of insulin mRNA and intracellular insulin content and this effect was prevented by PTX<sup>34</sup>. Also, another study found that epinephrine inhibited HIT-T15 cell expressions of a reporter gene

(gene whose products are easily detected) in a concentration-dependent manner that paralleled the inhibition of insulin secretion when they were transfected with the reporter gene driven by the human insulin gene 5'-regulatory sequence (promoters). This finding suggested that epinephrine may inhibit insulin secretion by decreasing the rate of insulin gene transcription<sup>35</sup>. However the mechanisms by which epinephrine inhibits gene transcription are not clear. Therefore, further studies are needed to clarify all the above statements<sup>1</sup>. The regulation of insulin secretion is of most importance in the maintenance of normal glucose homeostasis. Although glucose is the major stimulator of insulin secretion, autonomic nervous system can modulate the effect of glucose-induced insulin secretion from pancreatic  $\beta$ -cell. Moreover, the direct stimulation of parasympathetic and sympathetic nerve fibers can enhance and diminish insulin secretion, respectively. Under a stress, serum catecholamine concentrations are elevated or the sympathetic nervous system is activated, thereby decrease insulin secretion. Also, elevated catecholamine levels enhance glycogenolysis, thus increasing blood glucose that is the primary fuel for the brain and other critical organs. It is the mechanism underlying the fighting reflex of body under stress or pressure condition. This would be beneficial to the body system, if it occurs in short term or in emergency condition. In long term stress condition, however, it may contribute to the impairment of insulin secretion or glucose intolerance in type II diabetes mellitus or stress-induced glucose intolerance in non-diabetic persons and animals. Therefore, the understanding of the regulation of insulin secretion by autonomic nervous system is invaluable for both physiological and pathological views.

#### REFERENCES

1. Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, et al. Wortmanin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 1994; 54: 2419-2423.
2. Wollheim CB, Kikuchi M, Renold AE, et al. Somatostatin- and epinephrine-induced modifications of  $^{45}Ca^{2+}$  fluxes and insulin release in rat pancreatic islets maintained in tissue culture. *J Clin Invest* 1977; 60: 1165-1173.
3. Taniguchi H, Murakami K, Tsutou A, et al. A role of endogenous somatostatin and glucagon in insulin release from pancreatic islets. *Kobe J Med Sci* 1981; 27: 213-224.
4. Ejiri K, Taniguchi H, Ishihara K, et al. Effect of tris-(hydroxymethyl) aminomethane on biosynthesis and release of insulin in the pancreatic Langerhans islets. *Diabetes Res Clin Pract* 1985; 1: 73-79.

5. McDermott A, Sharp GWG. Inhibition of insulin secretion; a fail-safe system. *Cell Signalling* 1993; 5: 229-234.
6. Sharp GWG. Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol* 1996; 40:c 1781-c 1799.
7. Seaquist RE, Walseth TF, Redmon JB, et al. 6-Protein regulation of insulin secretion. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 338-345.
8. Ashcroft F, Harrison DE, Ashcroft SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic islets. *Nature Lond* 1984; 312: 446-448.
9. Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature Lond* 1984; 311: 271-273.
10. Dunne MJ, Findlay I, Petersen OH, et al. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in an insulin secreting cell line are inhibited by D-glyceraldehyde and activated by membrane permeabilization. *J Membr Biol* 1986; 93: 271-273.
11. Easom RA, Land M, Colca JR, et al. Effects of insulin secretagogues on protein kinase C-catalyzed phosphorylation of an endogenous substrate in isolated pancreatic islets. *J Biol Chem* 1990; 265: 14938-14946.
12. Henquin JC. The biophysical events involved in the stimulation of insulin release by arginine. In: *Guanidino Compounds in Biology and Medicine* 1992; 109-116.
13. Cable HC, El-Mansoury A, Morgan NG. Activation of alpha-2-adrenoceptors results in an increase in F-actin formation in HIT-T15 pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem J* 1995; 307: 169-174.
14. Gembal M, Gilon P, Henquin JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on secretion from pancreatic  $\beta$  cells. *J Mol Endocrinol* 1991; 6: 121-127.
15. Sato Y, Aizawa T, Komatsu M, et al. Dual functional role of membrane depolarization/Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetes* 1992; 41: 438-443.
16. Komatsu M, Schermerhorn T, Aizawa T, et al. Glucose stimulation of insulin release in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> and in the absence of any rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 728-732.
17. Tang S, Yaney GC, Sharp GWG. Unusual response to carbachol in the RINm5F cell. Evidence for a "distal" site of action in stimulus-secretion coupling. *Mol Pharmacol* 1995; 47: 863-870.
18. Ullrich S, Wollheim CB. GTP-dependent inhibition of insulin secretion by epinephrine in permeabilized RINm5F cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 8615-8620.
19. Jones PM, Fyles JM, Persaud SJ, et al. Catecholamine inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced insulin secretion from electrically permeabilized islets of Langerhans. *FEBS LETTERS* 1987; 219: 139-144.
20. Lundquist I. Cholinergic muscarinic effects on insulin release in mice. *Pharmacology* 1982; 25: 338-347.
21. Lever JD, Findlay JA. *Endocrin. Mem.* No. 19, London: Cambridge University Press, 1971: p.437.
22. Verspohl JE, Tacke R, Mutschler E, et al. Muscarinic studies. *Eur J Pharm* 1990; 178: 303-311.
23. Yamatani Y, Chiba T, Kadowaki S, et al. Dual action of protein kinase C activation in the regulation of insulin release by muscarinic agonist from rat insulinoma cell line (RINm5F). *Endocrinology* 1988; 122: 2826-2832.
24. Jones PM, Persaud SJ, Howell SL. Protein kinase C and the regulation of insulin ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse  $\beta$ -cells. *J Clin Invest* 1992; 89: 1288-1295.
25. Hughes SJ, Chalk JG, Ashcroft SJ. The role of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and protein kinase C in acetylcholine-induced insulin release in the clonal  $\beta$ -cell line, HIT-T15. *Biochem J* 1990; 267: 227-232.
26. Wollheim CB, Sharp GWG. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev* 1981; 61: 914-973.
27. Metz SA. Glucose increases the synthesis of lipoxygenase-mediated metabolites of arachidonic acid in intact rat islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 198-202.
28. Standaert ML, Cooper DR, Hernandez H, et al. Differential down-regulation of insulin-sensitive protein kinase C isoforms by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in rat adipocytes and BC<sub>3</sub>H-1 myocytes. *Endocrinology* 1993; 132: 689-692.
29. Howell SL, Montague W. Adenylate cyclase activity in isolated rat islets of Langerhans: effects of agents which alter rates of insulin secretion. *Biochem Biophys Acta* 1973; 320: 44-52.
30. Rabinovitch A, Cerasi E, Sharp GWG. Adeosine 3',5'-Monophosphate-dependent and-independent inhibitory effects of epinephrine on insulin release in rat pancreatic islets. *Endocrinology* 1978;

- 102: 1733-1738.
31. Ferro-Novick S, Jahn R. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature Lond* 1994; 370: 191-193.
  32. Rothman JE. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature Lond* 1994; 372: 55-63.
  33. Sollner T, Rothman JE. Neurotransmission: harnessing fusion machinery at the synapse. *Trends Neurosci* 1994; 8: 344-347.
  34. Zhang H-J, Redmon JB, Andersen JM, Robertson RP. Somatostatin and epinephrine decrease insulin messenger ribonucleic acid in HIT cells through a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Endocrinology* 1991; 129: 2409-2414.
  35. Redmon JB, Towle HC, Robertson RP. Ephinephrine and somatostatin inhibit insulin gene transcription in the HIT cell. *Diabetes* 1992; 41: 3A.

## **TREATMENT OF HAIR LOSS**

Srisombat Nawanopparatsakul

*Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand.*

### **ABSTRACT**

Most common problems associated with hereditary hair loss are androgenetic alopecia and alopecia areata both of which can be reversed if treated early and correctly. Among other therapeutic agents finasteride and minoxidil are two drugs that have been approved by U.S. FDA. for current treatment of such conditions. Although their mechanisms of action differ, both drugs are shown to be clinically proven with additive effect when used in combination. Future success in treatment of hair loss would require continuing research to develop new therapeutic approaches or judicious use of some otherwise existing drugs with other clinical indications.

**Key words :** hair loss, androgenetic alopecia, alopecia areata, finasteride, minoxidil

---

Address correspondence and reprint requests to : Srisombat Nawanopparatsakul, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, Nakhon Pathom 73000, Thailand.

## การรักษาโรคผมร่วง

ศรีสมบัติ นวนพรัตน์สกุล

ภาควิชาเภสัชวิทยาและพิษวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

### บทคัดย่อ

โรคผมร่วงทางพันธุกรรมที่พบบ่อยและเป็นปัญหาในปัจจุบันคือ androgenetic alopecia และ alopecia areata ซึ่งหากทำการรักษาได้อย่างถูกต้องผู้ป่วยสามารถกลับสู่สภาวะปกติได้ ยาที่ทางคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุมัติให้ใช้ในการรักษาโรคผมร่วงทางพันธุกรรมได้แก่ finasteride และ minoxidil ซึ่งผลการรักษาเป็นที่ยอมรับในวงการแพทย์ แม้ว่ายาทั้งสองจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน แต่เมื่อใช้ยาสองชนิดร่วมกันจะทำให้ผลการรักษาดีขึ้น ความสำเร็จในอนาคตสำหรับการรักษาโรคผมร่วงทางพันธุกรรมนั้นต้องการการศึกษาวิจัยที่ต่อเนื่องและพัฒนาการรักษาในแนวใหม่ รวมทั้งการตัดสินใจนำยาซึ่งมีข้อบ่งชี้อื่นมาใช้ในการรักษาโรคผมร่วง

คำสำคัญ : โรคผมร่วง, androgenetic alopecia, alopecia areata, finasteride, minoxidil

## บทนำ

ผมร่วง เป็นปัญหาที่พบบ่อยและก่อปัญหาทั้งด้านร่างกายและจิตใจแก่ผู้ประสบ ในปัจจุบันทางการแพทย์มียาที่ยอมรับให้ใช้ในการรักษาผมร่วงอยู่ 2 ชนิด คือ finasteride และ minoxidil โดยเมื่อใช้ยาชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิดร่วมกันแล้ว จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของผม ยาทั้งสองชนิดนี้มีอิทธิพลต่อวงจรการเจริญเติบโตของผม รวมทั้งเพิ่มความยาวและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของผมที่ยังมีอยู่ แม้ว่ายาทั้งสองชนิดจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน แต่ก็ให้ผลการรักษาที่เป็นที่ยอมรับในทางการแพทย์ บทความนี้จะกล่าวถึงการนำยาทั้งสองชนิดมาใช้ในการรักษาโรคผมร่วง 2 ชนิด คือ androgenetic alopecia และ alopecia areata ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของผมที่สามารถกลับสู่ปกติได้

## วงจรการเจริญเติบโตของผม

วงจรการเจริญเติบโตของผมแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ ระยะการเจริญเติบโต (anagen) ใช้เวลาประมาณ 2-6 ปี ระยะวิวัฒนาการ (catagen) ใช้เวลาประมาณ 2-3 สัปดาห์ และระยะหยุดการเจริญเติบโตหรือพัก (telogen) ใช้เวลาประมาณ 2-3 เดือน ตามด้วยการหลุดร่วงของผม และเริ่มต้นวงจรใหม่ อาการผมร่วงเกิดจากมีการรบกวนที่ระยะใดระยะหนึ่งของการเจริญเติบโตของผม โดยอาจมีอิทธิพลจากทางสรีรวิทยาหรือพยาธิวิทยา<sup>1,2</sup>

วงจรการเจริญเติบโตและการเข้าสู่ระยะพักของผมจะถูกควบคุมโดยการส่งผ่านข้อมูลที่สลับซับซ้อนระหว่างชั้นเยื่อบุผิวและชั้นหนังแท้ ซึ่งยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก โดยปกติในหนังศีรษะของคนทั่วไป จะมีผมอยู่ในระยะการเจริญเติบโตประมาณร้อยละ 90-95 อยู่ในระยะวิวัฒนาการประมาณน้อยกว่าร้อยละ 1 และผมที่หลุดจะอยู่ในระยะหยุดการเจริญเติบโตหรือพัก ประมาณร้อยละ 5-10 และเมื่อเข้าสู่ขั้นตอนสุดท้ายของระยะพัก ผมจะหลุดร่วงออกไปและมีการเจริญเติบโตของผมเข้าสู่วงจรใหม่ต่อไป มีรายงานว่าในแต่ละวันผมมากกว่า 100 เส้นจะอยู่ในระยะพักและมีการหลุดร่วงออกไป และจะมีการเจริญเติบโตทดแทนผมที่หลุดร่วงด้วยจำนวนที่เท่ากัน โดยเริ่มวงจรการเจริญเติบโตของผมใหม่ ระยะเวลาที่ผมอยู่ในระยะการเจริญเติบโต จะเป็นตัวกำหนดความยาวของผม และปริมาตรของรากผมเป็นตัวกำหนดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง บนหนังศีรษะของคนทั่วไปจะมีต่อมผมที่พร้อมจะเจริญเติบโตเป็นผมประมาณ 100,000 ต่อม ซึ่งจะเจริญเติบโตให้ผมที่ยาวและหนา ส่วนต่อมอื่น ๆ ที่บริเวณอื่นทั่วร่างกายจะให้ผมซึ่งมีลักษณะสั้น เส้นบาง ๆ และสีไม่เข้ม ต่อผมสามารถโตขึ้นหรือเล็กลงได้ ขึ้นกับอิทธิพลทั้งเฉพาะที่และทั่วร่างกายที่สามารถเปลี่ยนแปลงระยะเวลาการเจริญเติบโตของผม และปริมาตรของน้ำหล่อเลี้ยงรากผม ฮอร์โมนที่เข้ามามีบทบาทและมีอิทธิพลสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของผม คือ ฮอร์โมนแอนโดรเจนเมื่อเข้าสู่วัยหนุ่มสาว แอนโดรเจนจะทำให้

ขนาดของต่อมขนบริเวณเครา หน้าอก และ ขาใหญ่ขึ้น และทำให้ขนาดของต่อมขนทั่ว ร่างกายให้ขนที่มีลักษณะเหมาะสมในแต่ละ บริเวณ<sup>3</sup>

### โรคผมร่วงทางพันธุกรรม

ศีรษะล้านในผู้ชายทั่วไปเมื่อมีอายุสูง ขึ้นนั้นมีปัจจัยเกี่ยวข้อง 3 ประการ คือ ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม ปัจจัยทางด้าน ระบบต่อมไร้ท่อหรือฮอร์โมน และปัจจัยทาง ด้านกระบวนการเสื่อมหรือชราภาพของร่างกาย ปัจจัยทั้ง 3 มีความเกี่ยวข้องกัน โรคผมร่วงทางพันธุกรรมที่พบมากเป็นอันดับ แรกและเป็นปัญหาที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบ แพทย์คือ androgenetic alopecia รองลงมา คือ alopecia areata

Androgenetic alopecia เป็นโรคพันธุ กรรมที่มีการบางของเส้นผมที่ถูกเหนี่ยวนำ โดยฮอร์โมนแอนโดรเจน ลักษณะการบาง ของเส้นผมจะเริ่มตั้งแต่อายุ 12-40 ปี พบ ได้ทั้ง 2 เพศ และร้อยละ 50 จะแสดง ลักษณะทางพันธุกรรมนี้ก่อนอายุ 50 ปี ฮอร์โมนแอนโดรเจนเป็นตัวกระตุ้นให้ต่อม ผมในบริเวณที่ไวต่อแอนโดรเจนมีขนาดเล็ก และทำให้ช่วงระยะการเจริญเติบโตของเส้น ผมสั้นลง ทำให้เส้นผมที่ผลิตจากต่อมผม สั้นและบาง ลักษณะเส้นผมที่ได้จะมีความ ยาวและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่างกัน โดย ที่จำนวนต่อมผมต่อหน่วยพื้นที่ยังคงเท่าเดิม บริเวณหนังศีรษะที่ล้านและไม่ล้านมีความ แตกต่างกันในระดับของเอนไซม์ 5-alpha reductase (เอนไซม์ที่ใช้เปลี่ยนฮอร์โมน testosterone ให้เป็น dihydrotestosterone

ซึ่งเป็นตัวออกฤทธิ์) ในคนที่ เป็น androgenetic alopecia ทั้งเพศชายและหญิงจะมี ระดับเอนไซม์ 5-alpha reductase สูง มีตัว รับของแอนโดรเจนมากและระดับเอนไซม์ cytochrome P450 aromatase ต่ำ (เอนไซม์ ที่ใช้เปลี่ยน testosterone ให้เป็น estradiol) ใน androgenetic alopecia ไม่มีการตายของ ต่อมผม จึงเป็นภาวะที่สามารถผันกลับได้<sup>4-6</sup>

Alopecia areata เป็นโรคทาง autoimmune พบในประชากรของประเทศ สหรัฐอเมริกา ร้อยละ 2 มีตั้งแต่เป็นน้อยๆ (ร่วงเป็นหย่อมกลม) จนกระทั่งร่วงทั้งศีรษะ (alopecia totalis) หรือร่วงทั้งศีรษะและทั่ว ร่างกาย (alopecia universalis) พบได้ทุก เพศทุกวัยและทุกเชื้อชาติ<sup>3</sup> โรคที่อาจให้ ลักษณะคล้าย androgenetic alopecia อีก โรคหนึ่งคือ telogen effluvium<sup>3</sup> ซึ่งเกิดผม ร่วงจากภาวะทาง systemic หรือ metabolic เช่น โรคของต่อมธัยรอยด์ จากยา การขาด สารอาหาร หรือจากไข้ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนของเส้นผมระยะการ เจริญเติบโตต่อระยะพัก โดยเส้นผมในระยะ การเจริญเติบโตลดลงและเส้นผมในระยะ พักเพิ่มขึ้น อัตราส่วนของเส้นผมทั้งสอง ระยะลดลง และอัตราสูญเสียเส้นผมจะเพิ่ม ขึ้นเป็นประมาณ 300 เส้นต่อวัน

การรักษาที่สำคัญที่สุดคือการวินิจฉัย โรคที่ถูกต้อง ซึ่งทำได้ไม่ยาก ผู้ป่วยมักมา พบแพทย์เพราะสังเกตเห็นว่าผมบางลง ลักษณะเส้นผมจะบอกได้ชัดเจน อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยบางรายอาจวินิจฉัยได้ไม่ถ่า ยนัก แพทย์ทางโรคผิวหนังจะสามารถแยก โรค androgenetic alopecia จากภาวะอื่นที่ อาจให้ลักษณะคล้ายกัน คือ telogen efflu-

vium และ alopecia areata ได้ โดย androgenetic alopecia จะเห็นลักษณะการบางของเส้นผมเฉพาะแยกตามเพศ ถ้าเป็นเพศชาย จะใช้ Hamilton/Norwood classification ในเพศหญิง ใช้ Ludwig classification การดำเนินโรคเป็นมากขึ้นที่เล็กน้อย เส้นผมมีลักษณะบาง อายุที่เริ่มเป็นมักเป็นช่วงวัยเจริญพันธุ์หรือหลังจากนั้น โดยทั่วไปพบผมร่วงไม่มาก ผู้ป่วยจะไม่มาหาด้วยปัญหาผมร่วงจำนวนมาก และเมื่อใช้มือจับและดึงเส้นผม เส้นผมมักหลุดยาก ซึ่งต่างจาก telogen effluvium ที่ผู้ป่วยจะมาหาด้วยปัญหาผมร่วงจำนวนมาก และเมื่อใช้มือจับและดึงเส้นผม เส้นผมจะหลุดง่าย ส่วน alopecia areata จะมีลักษณะคล้ายๆ androgenetic alopecia ยกเว้นผมมักร่วงเป็นหย่อมๆ และเป็นเร็ว เมื่อใช้มือจับและดึงเส้นผมจะหลุดง่าย นอกจากนี้ชิ้นส่วนอื่นในร่างกายอาจหลุดร่วงง่าย ไม่เฉพาะหนังศีรษะเท่านั้น ผู้ป่วยหลายคนอาจมี androgenetic alopecia ร่วมกับ alopecia areata ได้<sup>7-11</sup>

## การรักษา

การรักษาผมร่วงเริ่มตั้งแต่ปี ค.ศ. 1965 โดยมีการใช้ testosterone ทาเฉพาะที่ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของเส้นผม จนกระทั่งในช่วงปี ค.ศ. 1980 มีรายงานการพบอาการขนตกในผู้ป่วยที่รับประทาน minoxidil เพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูง และมีการพัฒนา minoxidil เพื่อใช้ในการเร่งการเจริญเติบโตของเส้นผม มีการนำสารหลายตัวมาใช้เพื่อรักษาอาการผมร่วงเช่น viprostol ในรูปแบบยาแปะผิวหนัง,

diazoxide ในรูปแบบยาทาเฉพาะที่, ยาในกลุ่ม antiandrogen ที่ใช้แบบทาเฉพาะที่ เช่น citeronel, estrogen และ omexin พบว่าสารบางตัวไม่มีประสิทธิภาพในการรักษาเช่น viprostol และสารบางตัวมีข้อจำกัดเรื่องอาการข้างเคียง<sup>11,12</sup> มีการศึกษาหลายอย่างรวมทั้งผลิตภัณฑ์ทางสมุนไพร และ โลชั่นที่มียาต้านจุลชีพ (piroctone olamine และ triclosan) แต่มีข้อจำกัดในเรื่องประสิทธิภาพ นอกจากการใช้ยาในการรักษา ยังมีเครื่องมือทางกายภาพ เช่น electrichogenesis scalp tension relaxers ซึ่งมีการนำมาใช้รักษาผมร่วง การปลูกผม พบว่ามีประสิทธิภาพดี แต่จะถูกจำกัดด้วยค่าใช้จ่ายและความไม่สะดวกสบายต่างๆ อย่างไรก็ตาม เป้าหมายหลักในการรักษาผมร่วง โดยเฉพาะในเพศชาย จะสัมพันธ์กับระดับ dihydrotestosterone ต่อต่อมเส้นผม<sup>11,12</sup>

ในการรักษาโรคผมร่วงทางพันธุกรรม ชนิด androgenetic alopecia นั้น เป้าหมายของการรักษาคือเพิ่มการปกคลุมของเส้นผมบนหนังศีรษะและยืดอายุของเส้นผม ยาที่มีฤทธิ์ในการรักษามี 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผลปรับเปลี่ยนระดับฮอร์โมน (hormone modifier) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น<sup>3</sup>

1. ยาที่ออกฤทธิ์ผ่านทางฮอร์โมนแอนโดรเจน ซึ่งยังสามารถแบ่งย่อยตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น

1.1 ออกฤทธิ์ยับยั้งที่เอนไซม์ 5-alpha reductase ตัวอย่างยาที่มีขายในปัจจุบัน คือ finasteride

1.2 ออกฤทธิ์ยับยั้งที่ตัวรับของฮอร์โมนแอนโดรเจน ตัวอย่างยาที่มีขายในปัจจุบัน คือ cyproterone acetate และ

spironolactone

2. ยาที่ออกฤทธิ์ผ่านทางฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยหลักการแล้วสามารถจะใช้ได้โดยอาจใช้เป็นยาเฉพาะที่หรือให้เข้าไปในร่างกาย แต่ยังไม่มียาว่าให้ได้ผลดีในการรักษา

ยาอีกกลุ่มหนึ่งคือยาที่ออกฤทธิ์โดยไม่ผ่านทางระบบต่อมไร้ท่อ จะออกฤทธิ์โดยไปปรับเปลี่ยนกลไกการตอบสนองทางอื่นเรียกว่า biologic response modifier โดยอาจออกฤทธิ์เร่งการเจริญเติบโตของเซลล์ออกฤทธิ์โดยการขยายหลอดเลือด เร่งการเกิด angiogenesis หรือออกฤทธิ์เกี่ยวข้องกับ AMP modifier ยาที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ minoxidil

เนื่องจากยาที่ให้ผลการรักษาทางคลินิกค่อนข้างชัดเจนมีเพียง 2 ชนิด คือ finasteride และ minoxidil ในบทความนี้จะขอล่าวรายละเอียดเฉพาะยา 2 ชนิดนี้

## FINASTERIDE

เป็นยาในกลุ่ม 4-azasteroid ชื่อทางเคมีคือ 4-aza-androst-1-ene-17-carboxamide,N-(1,1-dimethylethyl)-3-OXO (5a,17) เดิมใช้ในการรักษาโรคต่อมลูกหมากโต (benign prostatic hyperplasia, BPH) ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 5-alpha reductase type 2 (ซึ่งพบมากบริเวณทางเดินปัสสาวะ อวัยวะสืบพันธุ์ และรากผม) ทำให้ testosterone ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น dihydrotestosterone ได้ Finasteride จะไม่จับกับตัวรับของฮอร์โมนแอนโดรเจนและไม่รบกวนผลของฮอร์โมน testosterone ดังนั้น

จึงไม่มีผลต่อการสร้างตัวอสุจิ ความต้องการทางเพศ และการเจริญเติบโตรวมถึงการพัฒนาของกล้ามเนื้อต่างๆ รวมทั้งไม่มีผลทาง androgenic, estrogenic และ progestrogenic ไม่มีผลต่อการควบคุมของ hypothalamic-pituitary-testicular axis หรือผลของสเทียรอยด์อื่นๆ เดิม finasteride ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคต่อมลูกหมากโต ต่อมามีการศึกษาทางคลินิกหลายการศึกษา จนกระทั่งในเดือนธันวาคม 1997 คณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ยอมรับให้ใช้ยาเม็ด finasteride 1 มิลลิกรัมต่อวัน ในการรักษา androgenetic alopecia ในผู้ชาย<sup>12</sup>

เมื่อให้โดยการรับประทาน finasteride จะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็ว ให้ความเข้มข้นสูงสุด 9.2 ไมโครกรัม/ลิตร ภายใน 1-2 ชั่วโมง มีค่าชีวสมมูลร้อยละ 80 โดยที่การมีหรือไม่มีอาหารในทางเดินอาหารไม่มีผลต่อการดูดซึม พบว่าร้อยละ 90 ของ finasteride จับกับพลาสมาโปรตีน ค่าปริมาตรการกระจายตัวที่ระดับยาคงที่เท่ากับ 76 ลิตรเมื่อให้ finasteride 5 มิลลิกรัมทางหลอดเลือดดำ และยาสามารถผ่านเข้าสู่สมองได้ Finasteride ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ Cytochrome P450 3A4 ที่ตับ โดยกระบวนการออกซิเดชัน ให้เมตาบอไลต์คือ  $\omega$ -hydroxy finasteride และอนุพันธ์ของ monocarboxylic acid ขับออกทางน้ำดี ค่าครึ่งชีวิตของการขจัดยาอยู่ในช่วง 3-6 ชั่วโมง โดยมีค่าเฉลี่ย 4.8 ชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิตนี้ไม่ขึ้นกับขนาดยา ในผู้ป่วยโรคไตและคนสูงอายุไม่จำเป็นต้องปรับขนาดยา แต่ยังไม่มียาข้อมูลเพียงพอว่าในผู้

ป่วยโรคตับต้องปรับขนาดยาหรือไม่ ไม่พบอันตรกิริยา (drug interaction) ที่ส่งผลกระทบต่อการรักษาทางคลินิกของ digoxin, propranolol, aminophylline, warfarin, glibenclamide หรือ antipyrine เมื่อให้ยาเหล่านี้ร่วมกับ finasteride ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อวัน มีรายงานเกี่ยวกับขนาดยาที่แนะนำคือ 1 มิลลิกรัมต่อวัน โดยต้องใช้ยาดูติดต่อกันอย่างน้อย 3 เดือน จึงจะเห็นผล และควรใช้ติดต่อกันเพื่อให้ได้ผลการรักษาสูงสุด ผลการรักษาจะหมดไปเมื่อหยุดใช้ยาประมาณ 12 เดือน ข้อมูลการใช้ finasteride ส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาที่ทำในเพศชาย ยังไม่มีรายงานการใช้รักษาผู้หญิงที่เป็น androgenetic alopecia แต่ควรหลีกเลี่ยงในหญิงตั้งครรภ์หรือคาดว่าจะตั้งครรภ์ เนื่องจากอาจทำให้ทารกพิการได้ นอกจากนี้ยังพบความเสี่ยงในการเกิด hypospadias ในทารกเพศชาย อาการข้างเคียงที่พบ มีเช่น ความต้องการทางเพศลดลง การแข็งตัวของอวัยวะเพศยากขึ้น และปริมาณน้ำอสุจิลดลง<sup>12,13</sup>

มีรายงานการศึกษาโดย Kaufman KD และคณะ ซึ่งศึกษาการใช้ finasteride ในการรักษาชายที่มีปัญหาผมร่วงแบบ androgenetic alopecia ในผู้ร่วมการทดลอง 1,553 คน (อายุ 18-41 ปี) ผู้ร่วมการทดลองได้รับยา finasteride 1 มิลลิกรัมต่อวันหรือได้รับยาหลอก ให้ยาเป็นเวลา 1 ปี โดยไม่ทราบว่าเป็นยาจริงหรือยาหลอก และมีผู้ร่วมการทดลอง 1,215 รายที่อยู่ในการทดลองต่อไปเป็นปีที่ 2 ได้ทำการการประเมินผลการรักษาโดยการนับจำนวนเส้นผมโดยตัวผู้รับยาเองและผู้วิจัย และการให้

คณะผู้เชี่ยวชาญประเมินจากรูปถ่าย ผลการทดลองพบว่า finasteride ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อวัน ทำให้ภาวะผมร่วงดีขึ้นด้วยวิธีการประเมินทุกรูปแบบ และสามารถชะลอการสูญเสียเส้นผมและทำให้เส้นผมงอกกลับใหม่ได้<sup>14</sup>

## MINOXIDIL

เป็นอนุพันธ์ของ piperidinopyrimidine ถูกพัฒนาขึ้นในรูปยารับประทานเพื่อใช้รักษาภาวะความดันโลหิตสูง แต่อาการข้างเคียงที่พบคือขนตก จึงได้มีการพัฒนายาเพื่อใช้ในการรักษาผมร่วง Minoxidil เพิ่มการเปิดของ ATP-sensitive potassium channel ทำให้เซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือดเกิดภาวะ hyperpolarization และความเข้มข้นของแคลเซียมในเซลล์ลดลง ทำให้หลอดเลือดขยายและลดความดันโลหิตได้<sup>21</sup> สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของ minoxidil เมื่อใช้ทาเฉพาะที่ในการรักษา androgenetic alopecia นั้น ยังไม่มีการศึกษาที่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ได้อย่างชัดเจน แต่คาดว่าเกิดจากการกระตุ้น potassium channel ทำให้หลอดเลือดขยายตัว ส่งผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผม เพิ่มเลือดที่ไปเลี้ยงบริเวณเส้นผม และอาจออกฤทธิ์กระตุ้นต่อผมในระยะพักโดยตรง แต่ไม่ได้มีผลให้มีการสร้างต่อผมเพิ่มขึ้น<sup>19,21</sup>

การดูดซึมผ่านผิวหนังภายหลังการทายาที่หนังศีรษะเกิดได้น้อยมาก การดูดซึมขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ตัวทำละลายที่ใช้ในตำรับ บริเวณที่ทา สภาพของผิวหนัง

ที่ทา เช่น เป็นแอลกอฮอล์ การดูดซึมเมื่อทาทาน้ำ 2% minoxidil ใน hydroalcoholic propylene glycol มีค่าประมาณร้อยละ 0.3-4.5 ของขนาดยาที่ทา การกระจายตัวของยาภายหลังทายังไม่มีการตรวจวัดอย่างสมบูรณ์ ชั้น stratum corneum เป็นตัวกีดกันการแพร่ของยาเข้าสู่กระแสเลือด ยาส่วนที่ถูกดูดซึมจะขับออกทางปัสสาวะเป็นส่วนใหญ่ ยาที่ทาอาจมีการสูญเสียไปเนื่องจากการสัมผัสกับมือ โดนเสื้อผ้า การระเหย การแทนที่ด้วยอากาศ ทำให้มีข้อจำกัดในการใช้<sup>19,21</sup>

อาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดจากการใช้ minoxidil ในรูปยาทาเฉพาะที่ได้แก่ ผิวน้ำแห้ง ผื่นคัน ผิวลอกเป็นสะเก็ด หรือเป็นแผ่น นอกจากนี้ยังมีอาการระคายเคืองหรือแสบร้อนเฉพาะที่ อาการดังกล่าวมักเป็นแบบไม่รุนแรง และผู้ใช้ยาจะทนต่อยาได้ดี สาเหตุของการระคายเคืองส่วนหนึ่งอาจเกิดจากแอลกอฮอล์ที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การใส่ผมปลอมหรือ hairpiece ก็ส่งเสริมให้เกิดการระคายเคืองได้ในบางคน สำหรับอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดกับระบบหัวใจและหลอดเลือดนั้น จะเกิดได้ในกรณีที่ใช้ยาเกินขนาดและจากการที่ยาถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดโดยมีปัจจัยสนับสนุน ได้แก่ ผิวน้ำแห้งลอกหรือฉีกขาด หรือผลจาก occlusive effect เป็นต้น<sup>21</sup>

คณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา ยอมรับให้ใช้ minoxidil เป็นยารักษาผมร่วงในปี ค.ศ. 1988 โดยใช้ในรูปยาน้ำทาหนังศีรษะความเข้มข้นร้อยละ 2 และในปี ค.ศ. 1997 ยอมรับยาน้ำทาหนังศีรษะความเข้มข้น ร้อยละ 5 โดย

ให้ชายในร้านขายยาได้โดยไม่ต้องใช้ใบสั่งแพทย์ ข้อเสียในการใช้ minoxidil คือต้องทาทันละ 2 ครั้ง ต้องทำให้น้ำศีรษะแห้งก่อนทาทา และต้องทาโดยตรงบนหนังศีรษะ<sup>19</sup>

สำหรับโรคผมร่วงทางพันธุกรรมชนิด alopecia areata จะใช้ยาในกลุ่ม immunomodulator ในการรักษา เช่น glucocorticoids หรือ anthralin รวมทั้ง biologic response modifiers (เช่น minoxidil) การรักษาโดยวิธีนี้จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นผม แต่ไม่ได้ป้องกันการสูญเสียของเส้นผม และไม่มีผลต่อสาเหตุหรือระยะเวลาดำเนินของโรค การรักษาต้องต่อเนื่องจนกระทั่งผมขึ้นมาแทนที่ ซึ่งต้องใช้เวลานาน การเลือกว่าจะใช้วิธีใดขึ้นกับอายุของผู้ป่วยและความรุนแรงของโรคที่เป็น ซึ่งการรักษาจะมีประสิทธิภาพดีในรายที่เป็นน้อยๆ<sup>11</sup>

## สรุป

ยาที่ให้ผลในการรักษาผมร่วงซึ่งคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา รับรองให้ใช้มีเพียง 2 ชนิด คือ ยา finasteride ในรูปรับประทาน ยอมรับให้ใช้รักษา androgenetic alopecia ในเพศชาย โดยการออกฤทธิ์จะมีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-alpha reductase type 2 ทำให้ระดับของ dihydrotestosterone ทั้งในเลือดและที่หนังศีรษะลดลง จึงลดการเกิด miniaturization ของเส้นผมได้ ส่วนยาอีกชนิดหนึ่งคือ minoxidil ในรูปยาน้ำทาเฉพาะที่ เป็นยาที่สามารถใช้ได้ทั้งในเพศชาย เพศหญิงและ

เด็ก ในหลายๆสภาวะรวมทั้ง androgenetic alopecia และ alopecia areata โดยยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ที่แน่ชัดนัก แต่ minoxidil ทำให้เส้นผมในระยะการเจริญเติบโตยืดยาวขึ้น และกระตุ้นเส้นผมที่อยู่ในระยะพักให้เจริญ ผลคือทำให้เส้นผมมีขนาดใหญ่ขึ้น มีความยาวเพิ่มขึ้น และมีการหลุดร่วงลดลง แนวทางการรักษา

ผมร่วงทางพันธุกรรมและปัญหาต่างๆ ของผมร่วงนั้น วิธีการหรือแนวทางการรักษาที่จะเป็นไปได้ขึ้นกับการศึกษาวิจัยที่ต่อเนื่องในการควบคุมวงจรการเจริญเติบโตของเส้นผมรวมทั้งพื้นฐานทางชีววิทยาของเส้นผม การพัฒนาการรักษาในแนวใหม่ ตลอดจนการตัดสินใจนำยาที่มีข้อบ่งใช้ในการรักษาอื่นมาใช้

### เอกสารอ้างอิง

1. Montagna W, Parakkal PF. The structure and function of skin. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Academic Press, 1974 : 186-219.
2. Uno H. Biology of hair growth. *Semin Reprod Endocrinol* 1986; 4:131-41.
3. Price V H Treatment of hair loss. *N Engl J Med* 1999; 23:964-973.
4. Olsen EA. Androgenetic alopecia. In : Olsen EA, ed. Disorders of hair growth : diagnosis and treatment. New York : McGraw-Hill, 1994 : 247-83.
5. Bergfeld WF. Androgenetic alopecia : an autosomal dominant disorder. *Am J Med* 1995; 98 : Suppl. 1A : 958-988.
6. Kaufman K. Androgen metabolism as it affects hair growth in androgenetic alopecia. *Dermatol Clin* 1996; 14 : 697-711.
7. Norwood OT. Male pattern baldness : classification and incidence. *South Med J*; 68(11):1359-65.
8. Sasson M, Shupack JL, Stiller MJ. Status of medical treatment for androgenetic alopecia. *Int J Dermatol* 1993; 32:701-6.
9. Price VH, Baden HP, De Villez RL, et al. Guidelines of care for androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35:465-8.
10. Hamilton JB. Patterned loss of hair in man : types and incidence. *Ann N Y Acad Sci* 1951; 53:708-28.
11. Shapiro J, Price VH. Hair regrowth : therapeutic agents. *Dermatol Clin* 1998; 16:341-56.
12. McClellan KJ, Markham A. Finasteride : review of its uses in male pattern hair loss. *Drugs* 1999; 57(1):111-126.
13. Peters DH, Sorkin EM. Finasteride : a review of its potential in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drugs* 1993; 46:177-208.
14. Kaufman KD, Olsen EA, Whithing D, et al. Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39(4 Pt 1):578-89.
15. Gormley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC, et al. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med* 1992;327:1185-91.
16. Sawaya ME, Price VH. Different levels of 5 $\alpha$ -reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J Invert Dermatol* 1997; 109:296-300.
17. Tian G. *In vivo* time-dependent inhibition of human steroid 5 $\alpha$ -reductase by finasteride. *J Pharm Sci* 1996; 85:106-11.
18. Rittmaster RS. Finasteride. *N Engl J Med* 1994; 330:120-5.
19. Buhl AE. Minoxidil's action in hair follicles. *J Invert Dermatol* 1991; 96:Suppl:735-749.
20. Imperato-McGinley J, Guerrero, Gautier T, et al. Steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency in man : an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974;186:1213-5.
21. American Society of Health-System Pharmacists. AHFS Drug Information. American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, 1999.
22. Lley CD. Minoxidil. *Therapeutic Drug Monitoring* 1999; 2 : 190-193.

23. Devillez RL, Jacobs JP, Szpunar CA. Androgenetic alopecia in the female treatment with a 2% topical minoxidil solution. *Archives of Dermatology* 1994; 130:303-307.
24. Shapiro J. Androgenetic alopecia in men : a new insights. *The Medical News* 1999; 23:37-38.
25. Paus R, Cotsarelis G. Mechanism of Disease : the biology of hair follicle. *N Engl J Med* 1999; 341: 491-497.
26. American Academy of Dermatology (2000, July 5) Hair loss [online]. Available on <http://www.aad.org/pamphlets/hairloss.html>.

## NEW DRUGS

### HYLAN G-F 20 : IN VISCOSUPPLEMENTATION OF OSTEOARTHRITIC KNEES

Supanimit Teekachunhatean, Chaichan Sangdee

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,  
Chiang Mai 50200, Thailand*

#### ABSTRACT

Viscosupplementation is based on the recognition that the elastoviscosity of synovial fluid in osteoarthritic joints is considerably lower than in normal joints which is resulted from reductions in the molecular size and concentration of hyaluronan (HA) in the synovial fluid. Viscosupplementation is therefore performed by intra-articular injection of HA or its derivatives in order to restore the elastoviscosity of the synovial fluid to normal or higher level. Since the limitation in viscosupplementation with HA preparation, hylans (chemically cross-linked HA) were developed. Hylan G-F 20 (Synvisc®), the particular hylans made up of hylan A in solution and hylan B gel slurry (80:20 v/v), are considered to be the rather ideal elastoviscous material used in viscosupplementation due to tissue and blood compatibility, permeability to metabolites and macromolecules, proper elastoviscous properties, and prolonged residence time. The mechanisms whereby hylan G-F 20 and HA preparations exert their therapeutic effects in osteoarthritis are believed to be mediated via several pathways such as restoration of elastoviscous properties of the synovial fluid, anti-inflammatory effect and anti-nociceptive effects, normalization of HA synthesis, and chondroprotection. In clinical trials, three weekly intra-articular injections of hylan G-F 20 are more effective than intra-articular injections of saline or lower molecular weight HA in treatment of osteoarthritic knees. In addition, hylan G-F 20 is at least as effective as NSAIDs in treating this condition, whereas the best results are found when both hylan G-F 20 and NSAIDs are combined. There are no reports on systemic reactions attributable to hylan G-F 20 treatment, while an incidence of local reactions (transient pain and swelling) is 2.1% per injection. Hylan G-F 20 is therefore indicated for the relief of pain in patients who have failed to respond adequately to conservative treatments and may be considered as an alternative to NSAIDs, particularly in patients at risk for complications related to NSAIDs therapy.

**Key words :** Hylan G-F 20, viscosupplementation, osteoarthritic knees

---

Address correspondence and reprint requests to : Chaichan Sangdee Ph.D., Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

## บทนำ

Hylans เป็นสารที่เกิดจากการนำ hyaluronan หลายๆ โมเลกุลมาเชื่อมต่อกัน<sup>1</sup> เมื่อใช้สารชนิดนี้ฉีดเข้าข้อเข่าที่เสื่อม (osteoarthritic knees) พบว่าสารนี้สามารถปรับความหนืดและความยืดหยุ่นของน้ำไขข้อให้ใกล้เคียงกับปกติ นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยลดอาการปวดข้อ และทำให้ข้อเคลื่อนไหวได้ดีขึ้น<sup>2</sup> การใช้ hylans หรือ hyaluronan ในรูปแบบต่างๆ ฉีดเข้าข้อเพื่อปรับคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำไขข้อนี้รวมเรียกว่า “การเสริมความหนืด” (viscosupplementation)<sup>2</sup>

## ความสำคัญของ hyaluronan ในน้ำไขข้อ

Hyaluronan หรือ hyaluronic acid (HA) เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (N-acetyl glucosamine และ glucuronic acid) ประมาณ 12,500 คู่ เรียงตัวซ้ำๆ และต่อกันเป็นสาย polysaccharide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4-5 ล้าน HA ในน้ำไขข้อสังเคราะห์จาก halocytes ของ synovial tissue โดยมีความเข้มข้นสูงถึง 2.5-4.0 mg/ml ทำให้สาย polysaccharide ของ HA เรียงซ้อนอัดแน่น และประสานกันเป็นร่างแห (network)<sup>3,4</sup>

เมื่อมีการเคลื่อนไหวอย่างช้าๆ (ความถี่ต่ำ) และไม่รุนแรง แรงที่ผ่านเข้าสู่ข้อจะกระจายไปยังร่างแห HA อย่างช้าๆ ทำให้ร่างแห HA มีเวลาพอที่จะปรับการเรียงตัวโมเลกุลตามทิศทางของแรงที่ผ่านเข้ามา ส่งผลให้น้ำไขข้อไหล (flow) และเกิดการ

หล่อลื่น ลักษณะเช่นนี้ทำให้น้ำไขข้อมีคุณสมบัติหนืด (viscous) แต่ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการเคลื่อนไหวอย่างรวดเร็ว (ความถี่สูง) และรุนแรง ร่างแห HA จะไม่มีเวลาเพียงพอที่จะจัดเรียงโมเลกุลใหม่ ดังนั้นมันจึงเปลี่ยนมาทำหน้าที่คล้ายขดสปริงเพื่อกักเก็บและดูดซับแรงดังก้าวแทน ลักษณะเช่นนี้ทำให้น้ำไขข้อมีคุณสมบัติยืดหยุ่น (elastic) ดังนั้น HA ในน้ำไขข้อจึงเป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้น้ำไขข้อมีทั้งคุณสมบัติยืดหยุ่นและหนืด (elastoviscosity)<sup>4</sup>

## การเปลี่ยนแปลงของ hyaluronan ในน้ำไขข้อของข้อที่เสื่อม

จากการวิเคราะห์น้ำไขข้อจากข้อที่เสื่อม (osteoarthritic joints)<sup>4-6</sup> พบว่าความเข้มข้นของ HA ลดลงเหลือ 1-3 mg/ml ทั้งนี้เชื่อว่าจะน่าจะเป็นผลจากการที่ HA ถูกเจือจางด้วยปริมาณน้ำในข้อที่มากเกินไปเนื่องจากการอักเสบภายในข้อ นอกจากนี้ยังพบว่า น้ำหนักโมเลกุลของ HA ลดลงเหลือ 1-4 ล้าน ซึ่งเป็นผลจากการตัดทำลายโมเลกุลของ HA หรืออาจเนื่องมาจากการสร้าง HA ที่ผิดปกติไปจากเดิม การลดลงของความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลนี้ มีผลลดการเรียงซ้อน และการอัดแน่นของร่างแห HA ทำให้น้ำไขข้อมี elastoviscosity ลดลง (ตารางที่ 1) ส่งผลให้ความสามารถในการหล่อลื่นและดูดซับแรงที่กระทำต่อข้อลดลง ดังนั้น เมื่อมีแรงที่ส่งผ่านเข้ามาในข้อในขณะที่มีการเคลื่อนไหว แรงดังก้าวก็มีโอกาสที่จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อผิวกระดูกอ่อน และ synovial tissue ได้มากขึ้น

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบ elastoviscosity\* ของน้ำไขข้อกับ HA น้ำหนักโมเลกุล 750,000 และ hylan G-F 20 (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 2-4,7)

	น้ำไขข้อจากเข่า		1% HA น้ำหนักโมเลกุล 750,000	Hylan G-F 20 (น.น.โมเลกุล 6,000,000)
	คนปกติ	ผู้ป่วยข้อเข่าเสื่อม		
G' (Pa)	23	8	16	87
G'' (Pa)	7	5	9	19

G' หมายถึง dynamic elastic (storage) modulus แสดงความยืดหยุ่น (elasticity)

G'' หมายถึง viscous elastic (loss) modulus แสดงความหนืด (viscosity)

\*ทดสอบที่ความถี่ 2.5 เฮิรตซ์ ซึ่งเทียบได้กับการเคลื่อนไหวในขณะวิ่ง

**Hylan G-F 20 กับการเสริมความหนืดแก่น้ำไขข้อ (viscosupplementation)**

เนื่องจากน้ำไขข้อของข้อเสื่อมมี elastoviscosity ลดลง ดังนั้นวิธีการแก้ไขวิธีหนึ่งคือการเสริมสารเพิ่มความยืดหยุ่นและความหนืดแก่น้ำไขข้อ ซึ่งเรียกสั้น ๆ ว่า “การเสริมความหนืด” (viscosupplementation) ทั้งนี้ สารในอุดมคติที่เหมาะสมควรมีคุณสมบัติดังนี้<sup>2</sup>

1. ไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่พึงประสงค์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน ตลอดจนถึงไม่ทำปฏิกิริยากับเซลล์หรือโปรตีนในเลือด

2. ยอมให้ metabolites และ macromolecules บางชนิด รวมถึงโปรตีนต่าง ๆ และสารระดับโมเลกุลในเลือดซึมผ่านได้

3. ควรจะมี elastoviscosity ที่สูงกว่าปกติ เนื่องจากเมื่อฉีดเข้าไปในข้อที่เกิดพยาธิสภาพ สารดังกล่าวมีโอกาสที่จะถูกเจือจางด้วยน้ำไขข้อที่มี elastoviscosity ต่ำ

4. สามารถอยู่ในข้อได้นาน ก่อนหน้านี้นี้ได้มีการนำ viscosupplementation มาใช้รักษาโรคข้อเสื่อมโดยใช้สาร

ที่เตรียมได้จาก HA เช่น noninflammatory fraction of Na-hyaluronan (NIF-NaHA) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 ล้านหรือ HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5-7 แสน อย่างไรก็ตาม พบว่าสารเหล่านี้มีคุณสมบัติตรงตามข้อ 1 และ 2 แต่ยังขาดคุณสมบัติตามข้อ 3 (ตารางที่ 1) และ 4<sup>2</sup> อย่างไรก็ตาม เนื่องจากขั้นตอนที่ทำให้ HA บริสุทธิ์นั้นมีส่วนทำให้ขนาดโมเลกุลเล็กลง ปัจจุบันนี้ทำให้การเพิ่มขนาดโมเลกุลของ HA ทำได้ยาก ด้วยเหตุนี้จึงมีการแก้ไขข้อบกพร่องดังกล่าวโดยการนำ HA หลายๆ โมเลกุลมาต่อเชื่อมกัน (cross-linked) เพื่อเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลและ elastoviscosity<sup>1</sup> ตลอดจนทำให้อยู่ในข้อได้นานขึ้น<sup>8</sup> การเชื่อมกันนี้ทำได้โดยการเชื่อม hydroxyl groups ของ HA หลายๆ โมเลกุลไว้ด้วยกัน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง 3 functional groups ที่เหลือซึ่งได้แก่ N-acetyl, carboxylic และ reducing end groups โมเลกุลที่ได้จากการเชื่อมด่อนี้เรียกชื่อใหม่ว่า “hylans” ซึ่งมี 2 ชนิดคือ hylan A รูปแบบของเหลว (fluid) และ hylan B รูปแบบเจล (gel) ปัจจุบันได้มีการนำ hylan A กับ B ในอัตราส่วนโดย

ปริมาตร 80:20 มาผลิตเป็นสารที่ใช้ใน viscosupplementation โดยใช้ชื่อ hylan G-F 20 (Synvisc®)<sup>1</sup> สารชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6 ล้านและมี elasto-viscosity ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 จากการศึกษาเกี่ยวกับเวลาที่ hylan G-F 20 สามารถคงอยู่ในข้อ (residence time)<sup>8</sup> พบว่า ภายใน 24 ชั่วโมงหลังฉีดสารนี้เข้าสู่ข้อเข้าของกระดูกข้อ สสารส่วนใหญ่จะเคลื่อนย้ายจากน้ำไขข้อเข้าสู่ synovial tissues และส่วนผิวของกระดูกอ่อน และเมื่อเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ พบว่า hylans ในน้ำไขข้อลดปริมาณลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ยังคงพบสารนี้ได้ใน synovial tissues และส่วนผิวของกระดูกอ่อน แต่เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน hylans ที่อยู่ในทุกส่วนของข้อจะถูกขจัดออกจากข้อไปจนเกือบหมด โดยที่ไม่พบการสะสมของสารนี้ในอวัยวะอื่นของร่างกาย จากการศึกษาดังกล่าวแสดงว่า hylan G-F 20 ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ประมาณ 7 วันภายในข้อนั้น สามารถอยู่ในข้อได้นานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ 1% HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3 ล้าน ซึ่งสามารถอยู่ในข้อได้โดยมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เพียง 12 ชั่วโมง เท่านั้น<sup>9</sup>

#### กลไกการออกฤทธิ์ของสารเสริมความหนืดในการรักษาโรคข้อเสื่อม

ถึงแม้ว่าปัจจุบันจะยังไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารเสริมความหนืดได้อย่างครบถ้วน แต่เชื่อว่ากลไกที่น่าจะทำให้สารนี้มีประสิทธิผลในการรักษาโรคข้อเสื่อม ได้แก่

#### 1. การปรับ elastoviscosity ของน้ำไขข้อให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติ

การดูด (aspiration) น้ำไขข้อที่มากเกินไปออกจากข้อที่เสื่อมและฉีดสารเสริมความหนืดเข้าสู่ข้อ มีส่วนช่วยปรับ elastoviscosity ของน้ำไขข้อได้ชั่วคราว ส่งผลให้มีการปรับปรุงความสามารถในการหล่อลื่นและดูดซับแรงที่กระทำต่อข้อให้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม มีหลักฐานแสดงว่าการให้ hylan G-F 20 อาจให้ผลการรักษาโรคข้อเสื่อมได้ยาวนานกว่าเวลาที่สารนี้อยู่ในข้อ<sup>2</sup> (ดูหัวข้อ “ประสิทธิผลทางคลินิกของ hylan G-F 20” ประกอบ) ทั้งนี้เชื่อว่่าน่าจะเป็นผลมาจากกลไกอื่น ๆ ที่จะกล่าวถึงในข้อต่อไป

#### 2. ฤทธิ์ระงับการอักเสบ

มีหลักฐานจำนวนไม่น้อยที่สนับสนุนแนวคิดที่ว่า สารเสริมความหนืดมีฤทธิ์ระงับการอักเสบได้โดยผ่านกลไกทางกายภาพและเคมี (physicochemical mechanism) ซึ่งเป็นกลไกที่ไม่จำเพาะและไม่เกี่ยวข้องกับกลไกทางเภสัชวิทยา<sup>10-12</sup> จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยสามารถยับยั้ง phagocytosis<sup>12-14</sup>, cell migration<sup>12,15,16</sup>, lymphocyte activation<sup>16,17</sup> และ prostaglandin release<sup>18</sup> อย่างไรก็ตาม พบว่า HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความสามารถในการยับยั้งได้มากกว่า HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แม้ว่าจะมีความหนืดหรือความเข้มข้นเท่ากัน<sup>12</sup>

### 3. ฤทธิ์ระงับปวด

ฤทธิ์ระงับปวดของสารเสริมความหนืดอาจเป็นผลทางอ้อมอันเนื่องมาจากฤทธิ์ระงับการอักเสบที่กล่าวไว้ข้างต้น<sup>19</sup> อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าสารนี้ยังอาจออกฤทธิ์ระงับปวดได้โดยผ่านกลไกต่าง ๆ ดังนี้

3.1 ลดความเข้มข้นของ bradykinin และ prostaglandin E<sub>2</sub> ซึ่งเป็น pain mediators ในน้ำไขข้อของข้อที่ถูกเหนี่ยวนำให้อักเสบ<sup>20</sup>

3.2 สามารถกักเก็บ (entrap) สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับความปวด (pain substances) ไว้ในโมเลกุลของ HA<sup>21</sup>

3.3 ลดการส่งสัญญาณจากเส้นใยประสาทที่รับความรู้สึกปวดจากข้อที่มีพยาธิสภาพ ซึ่งกลไกส่วนนี้อาจเนื่องมาจากการที่สารเสริมความหนืดสามารถเคลือบพื้นที่ผิวภายในข้อ ทำให้ตัวรับความรู้สึกเจ็บถูกกระตุ้นได้ยากขึ้น<sup>21,22</sup>

นอกจากนี้ ยังพบว่าฤทธิ์ระงับปวดเหล่านี้แปรผันตรงกับน้ำหนักโมเลกุลและ elastoviscosity ของสารที่นำมาใช้เป็นสารเสริมความหนืดอย่างมีนัยสำคัญ

### 4. ฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์ HA ของ halocytes

จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า การให้ HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสามารถกระตุ้น halocytes ของข้อที่เสื่อมให้สังเคราะห์ HA เพิ่มขึ้นได้เกือบ 2 เท่า<sup>23</sup>

5. ฤทธิ์ป้องกันการทำลายกระดูกอ่อน (chondroprotective effects) จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า การให้ HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือความ

หนืดสูงมีฤทธิ์ป้องกันการทำลายกระดูกอ่อนได้จากการกระตุ้นการสร้าง tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1)<sup>24</sup> และยับยั้งการทำลายกระดูกอ่อนจากเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (neutrophil-mediated cartilage degradation)<sup>25</sup> นอกจากนี้ยังพบว่า hylans สามารถลดการทำลายกระดูกอ่อนที่เกิดจาก interleukin-1, degradative enzyme และ oxygen-derived free radicals<sup>26</sup> ซึ่งในกรณีดังกล่าวนี้ hylans ออกฤทธิ์ป้องกันได้ดีกว่า HA

จากการศึกษาโดยการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดโรคข้อเสื่อมโดยวิธีต่าง ๆ เช่น anterior cruciate ligament (ACL) transection หรือ meniscectomy<sup>27,28</sup> พบว่า HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีผลชะลอการเกิดโรค ตลอดจนลดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่เกิดกับกระดูกอ่อนและชั้นกระดูกใต้กระดูกอ่อน (subchondral bone) นอกจากนี้ยังสามารถลดความรุนแรงของการทำลายกระดูกอ่อนได้ด้วย

ประสิทธิผลทางคลินิกของ hylan G-F 20 ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม การศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง hylan G-F 20 กับ ยาหลอก

จากการศึกษาแบบ prospective, multicenter, randomized, double-blind โดยการฉีด hylan G-F 20 จำนวน 2 มิลลิลิตร เข้าข้อเข่าห่างกันสัปดาห์ละครั้ง จำนวน 2 ครั้ง กับ 3 ครั้ง ตามลำดับ เปรียบเทียบกับการฉีดน้ำเกลือ (physiologic saline) เข้าข้อเข่า และติดตามผลหลังฉีด

ยาดครั้งแรกนาน 12 สัปดาห์<sup>29</sup> พบว่า การให้ hylan G-F 20 ทั้ง 2 วิธีสามารถลดความเจ็บปวดขณะที่ข้อเข่ารับน้ำหนักซึ่งประเมินจาก visual analog score (VAS) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ การฉีดน้ำเกลือ ซึ่งพบความแตกต่างนี้ได้ตั้งแต่ สัปดาห์ที่ 3 ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 12 (รูปที่ 1) และยังพบว่า การให้ยาแบบ 3 ครั้ง สามารถลด VAS ได้มากกว่าแบบ 2 ครั้ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 เป็นต้นไป นอกจากนี้การประเมินผลการรักษาจากตัวชี้วัดอื่นก็ให้ผลคล้ายคลึงกับผลที่ได้กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นการให้ยาแบบ 3 ครั้งนี้จึงถือเป็นขนาดยาที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยต่อๆ มา และยังเป็นวิธีการที่แนะนำให้ใช้ในเวชปฏิบัติอีกด้วย

นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาแบบ multicenter, randomized, double-blind ที่เปรียบเทียบระหว่าง hylan G-F 20 ฉีดเข้าข้อเข่าห่างกันสัปดาห์ละครั้งรวม 3 ครั้ง กับการใช้น้ำเกลือฉีดเข้าข้อเข่า การศึกษานี้ติดตามผลหลังฉีดยาครั้งแรกนาน 26 สัปดาห์<sup>30</sup> พบว่า hylan G-F 20 มีผลทำให้ VAS ของตัวชี้วัดทางคลินิกต่างๆ (เช่น อาการปวดขณะลงน้ำหนัก อาการปวดตอนกลางคืน อาการปวดขณะเคลื่อนไหวเข่าในท่าที่ทำให้ปวดมากที่สุด ความสามารถในการทำงาน ผลการรักษาโดยรวม ฯลฯ) เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ การฉีดน้ำเกลือ นอกจากนี้ ยังพบว่า ร้อยละของผู้ป่วยที่ปลอดอาการ (symptom free) ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย hylan G-F 20 มีมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ

น้ำเกลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

**การศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง hylan G-F 20 กับ HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ**

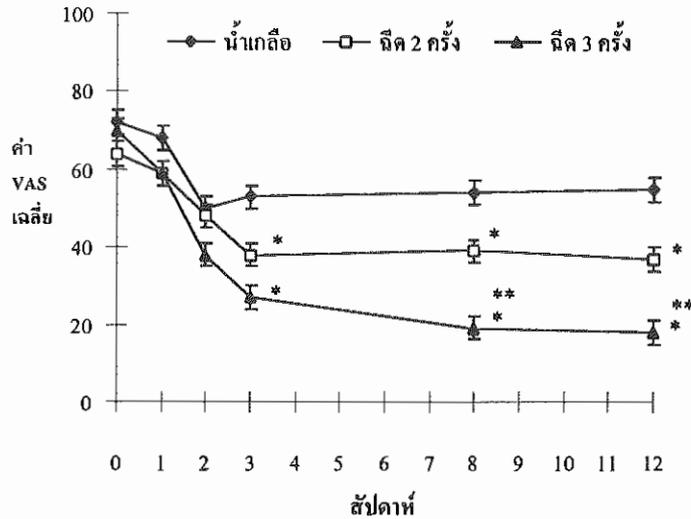
จากการศึกษาแบบ multicenter, randomized, double-blind เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลของ hylan G-F 20 กับ 1% HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 750,000 ในการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อม โดยวิธีฉีดยาเข้าข้อเข่าห่างกันสัปดาห์ละครั้งรวม 3 ครั้ง และติดตามผลหลังฉีดยาครั้งแรกนาน 12 สัปดาห์<sup>31</sup> พบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับ hylan G-F 20 มีการเปลี่ยนแปลง VAS ของตัวชี้วัดพื้นฐาน (ได้แก่ อาการปวดขณะลงน้ำหนัก อาการปวดขณะเคลื่อนไหวเข่าในท่าที่ทำให้ปวดมากที่สุด) ผลการรักษาโดยรวมเป็นไปในทางที่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ การรักษาด้วย HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อประเมินจากตัวชี้วัดต่างๆ เกือบทุกตัว ร้อยละของผู้ป่วยที่ปลอดอาการ (symptom free) ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วย hylan G-F 20 มีมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ HA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอย่างมีนัยสำคัญ

**การศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง hylan G-F 20 กับ NSAIDs**

จากการศึกษาเปรียบเทียบการรักษาโรคข้อเข่าเสื่อมด้วย hylan G-F 20 (เข้า 31 ข้าง) กับ NSAIDs (เข้า 34 ข้าง) และ hylan G-F 20 ร่วมกับ NSAIDs (เข้า 37

ข้าง) โดยศึกษาแบบ multicenter, prospective, randomized, double-blind และใช้ hylan G-F 20 ในขนาดเดียวกับที่ได้

กล่าวมาข้างต้น<sup>32</sup> พบว่า ณ สัปดาห์ที่ 12 hylan G-F 20 ให้ผลการรักษาไม่ด้อยกว่าการใช้ NSAIDs อย่างเดียว (เมื่อ



รูปที่ 1 คะแนนความเจ็บปวด (VAS) ขณะที่ข้อมเข่ารับน้ำหนักซึ่งประเมินจากผู้ป่วยโดยใช้ VAS 100 มิลลิเมตร (0=ไม่ปวด และ 100=ปวดมากจนทนไม่ไหว) \* $p < 0.05$  เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม, \*\*  $p < 0.05$  เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการฉีดยาแบบ 2 ครั้ง (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 29)

ตารางที่ 2 ร้อยละของผู้ป่วยที่ปลอดอาการประเมิน ณ สัปดาห์ที่ 12 และ 26<sup>†</sup> (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิงหมายเลข 30)

ตัวชี้วัด	Hylan G-F 20 (เข้า 57 ข้าง)	น้ำเกลือ (เข้า 60 ข้าง)
การประเมินของผู้ป่วย ณ สัปดาห์ที่ 12		
อาการปวดขณะข้อมเข่ารับน้ำหนัก	56*	12
อาการปวดตอนกลางคืน	82*	53
อาการปวดขณะเคลื่อนไหวเข่าในท่าที่ทำให้ปวดมากที่สุด	60*	13
ผลการรักษาโดยรวม	70*	18
การประเมินของแพทย์ ณ สัปดาห์ที่ 12		
อาการปวดขณะข้อมเข่ารับน้ำหนัก	47*	8
อาการปวดตอนกลางคืน	77*	42
การเสียความสามารถในการทำงาน	60*	17
ผลการรักษาโดยรวม	51*	15
การประเมินของแพทย์ ณ สัปดาห์ที่ 26 <sup>††</sup>		
อาการปวดขณะลงน้ำหนัก	39*	13
อาการปวดตอนกลางคืน	71*	45
การเสียความสามารถในการทำงาน	59*	27

<sup>†</sup> ผู้ป่วยที่ปลอดอาการ หมายถึงผู้ป่วยที่มี VAS อยู่ในช่วง 0-20 หรือมีการเปลี่ยนแปลงของคะแนนไปในทางที่ดีขึ้นจนอยู่ในช่วง 80-100 คะแนนเมื่อประเมินโดยใช้สเกลเดียวกัน, \*  $p < 0.005$ , <sup>††</sup> ไม่มีการประเมินผลการรักษาโดยรวม ณ สัปดาห์ที่ 26

พิจารณาผลการรักษาจากตัวชี้วัดที่เกี่ยวข้องกับความเจ็บปวด และการประเมินโดยรวม) และเมื่อประเมินผลจากร้อยละของผู้ป่วยที่ปลอดอาการ ณ สัปดาห์ที่ 26 พบว่า การใช้ hylan G-F 20 อย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับ NSAIDs มีโอกาสให้ผลการรักษาดีกว่าการใช้ NSAIDs เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 3)

### ผลข้างเคียงของ hylan G-F 20

จากการศึกษาเกี่ยวกับผลข้างเคียงพบว่า hylan G-F 20 ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบต่างๆ ของร่างกาย (systemic adverse events) แต่อาจพบผลข้างเคียงเฉพาะที่ (เช่นปวดและบวมข้อ) โดยมีอุบัติการณ์ประมาณร้อยละ 2.1-2.7 (หมายถึงมีโอกาสเกิด 2.1-2.7 ครั้งต่อการฉีด 100 ครั้ง)<sup>33</sup> ผลข้างเคียงเหล่านี้หายได้ภายในระยะเวลาไม่กี่วัน ทั้งนี้ควรให้การรักษาตามอาการ (เช่น พักข้อ ยกขาสูง ประคบข้อด้วย

น้ำแข็งหรือน้ำอุ่น และให้ยาแก้ปวด) ถ้าจำเป็นอาจต้องดูดน้ำไขข้อออก นอกจากนี้ในกรณีที่อาการรุนแรงมากและพิสูจน์ได้ว่าไม่มีการติดเชื้อภายในข้ออาจพิจารณาฉีด corticosteroids เข้าข้อได้<sup>34</sup>

### ข้อบ่งชี้ของ hylan G-F 20

Hylan G-F 20 เป็นสารเสริมความหนืดที่ใช้น้ำบำบัดอาการปวดเนื่องจากโรคข้อเข่าเสื่อม ซึ่งอาจพิจารณาเลือกใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อ conservative treatments (เช่น การใช้ยาแก้ปวดพาราเซตามอล หรือ NSAIDs) นอกจากนี้ ยังอาจใช้เป็นการรักษาทางเลือกสำหรับผู้ป่วยที่ไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงของ NSAIDs ได้และผู้ป่วยที่ไม่พร้อมที่จะรับการรักษาด้วยการผ่าตัดเปลี่ยนข้อเข่าเทียม (TKR, Total knee replacement)

ตารางที่ 3 ร้อยละของผู้ป่วยที่ปลอดอาการ ณ สัปดาห์ที่ 26 หลังรักษา\* (ดัดแปลงจากเอกสารอ้างอิง หมายเลข 32)

ตัวชี้วัด	NSAIDs (%)	Hylan G-F 20 (%)	NSAIDs ร่วมกับ Hylan G-F 20 (%)
อาการปวดขณะเคลื่อนไหว	6	30 <sup>†</sup>	28 <sup>†</sup>
อาการปวดขณะพัก	48	48	81 <sup>†‡</sup>
อาการปวดตอนกลางคืน	48	63	81 <sup>†</sup>
การประเมินผลโดยรวม	10	19	25

\* ผู้ป่วยที่ปลอดอาการ หมายถึง ผู้ป่วยที่มี VAS ต่ำกว่า 20 มิลลิเมตร (ใช้ VAS สเกล 100 มิลลิเมตร),

<sup>†</sup>  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NSAIDs, <sup>‡</sup>  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Hylan G-F 20

เอกสารอ้างอิง

1. Balazs EA, Leshchiner EA. Hyaluronan, its crosslinked derivative hylan and their medical applications. In: Inagaki H, Phillips GO, eds. Cellulosics Utilization: Research and Rewards in Cellulosics. New York: Elsevier Applied Science 1989: 223-41.
2. Balazs EA, Denlinger JL. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1993; 20: 3-9.
3. Balazs EA, Gibbs DA. The rheological properties and biological function of hyaluronic acid. In: Balazs EA, ed. Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix. London/New York: Academic Press 1970: 1241-54.
4. Balazs EA. Viscoelastic properties of hyaluronic acid and biological lubrication. *Univ Mich Med Cent J* 1968; S255-9.
5. Balazs E, Briller S, Denlinger J. N-hyaluronate molecular size variations in equine arthritis and human arthritic synovial fluids and the effect on phagocytic cells. In: Talbot J, ed. Seminars in Arthritis and Rheumatism. New York: Grune & Stratton 1981: 141-3.
6. Balazs E. The physical properties of synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. In: Helfet A, ed. Disorders of the Knee, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott 1982: 61-74.
7. Wobig M, Bach G, Beks P, Dickhut A, et al. The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan -G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. *Clin Ther* 1999; 21(9): 1549-62.
8. Band P, Goldman A, Barbone A, Reiner K, Balazs EA. Intra-articular distribution and residence time of hylan polymers (Abstract 433). Materials Research Society, Spring Meeting. San Francisco; 1995.
9. Brown TJ, Laurent UB, Fraser JR. Turnover of hyaluronan in synovial joints: elimination of labelled hyaluronan from the knee joint of the rabbit. *Exp Physiol* 1991; 76(1): 125-34.
10. Ghosh P. The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12(1): 75-82.
11. Goa KL, Benfield P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* 1994; 47(3): 536-66.
12. Balazs EA and Darzynkiewicz Z. The effect of hyaluronic acid on fibroblasts, mononuclear phagocytes and lymphocytes. In: Kulonen E, Pikkarainen J, eds. Biology of the Fibroblast. London: Academic Press 1973: 237-52.
13. Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 1980; 40(3): 435-46.
14. Pisko EJ, Turner RA, Soderstrom LP, Panetti M, Foster SL, Treadway WJ. Inhibition of neutrophil phagocytosis and enzyme release by hyaluronic acid. *Clin Exp Rheumatol* 1983; 1(1): 41-4.
15. Partsch G, Schwarzer C, Neumuller J, Dunky A, et al. Modulation of the migration and chemotaxis of PMN cells by hyaluronic acid. *Z Rheumatol* 1989; 48(3): 123-8.
16. Peluso G, Perbellini A, Tajana G. The effect of high and low molecular weight hyaluronic acid on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *Curr Ther Res* 1990; 47: 437-43.
17. Darzynkiewicz Z, Balazs EA. Effect of connective tissue intercellular matrix on lymphocyte stimulation I. Suppression of lymphocyte stimulation by hyaluronic acid. *Exp Cell Res* 1971; 66: 113-23.
18. Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, Hayaishi M, Ando T. The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions* 1992; 37(1-2): 155-6.
19. Schaible HG, Schmidt RF. Effects of an experimental arthritis on the sensory properties of fine articular afferent units. *J Neurophysiol* 1985; 54(5): 1109-22.
20. Aihara S, Murakami N, Ishii R, Kariya K, et al. Effects of sodium hyaluronate on the nociceptive response of rats with experimentally induced arthritis. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1992; 100(4): 359-65.

21. Gotoh S, Miyazaki K, Onaya J, Sakamoto T, Tokuyasu K, Namiki O. Experimental knee pain model in rats and analgesic effect of sodium hyaluronate. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1988; 92(1): 17-27.
22. Pozo MA, Balazs EA, Belmonte C. Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative. *Exp Brain Res* 1997; 116(1): 3-9.
23. Vuorio E, Einola S, Hakkarainen S, Penttinen R. Synthesis of under-polymerized hyaluronic acid by fibroblasts cultured from rheumatoid and non-rheumatoid synovitis. *Rheumatol Int* 1982; 2(3): 97-102.
24. Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K. Effects of hyaluronan on the production of stromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in bovine articular chondrocytes. *Biomed Res* 1992; 13: 343-8.
25. Tobetto K, Nakai K, Akatsuka M, Yasui T, Ando T, Hirano S. Inhibitory effects of hyaluronan on neutrophil-mediated cartilage degradation. *Connect Tissue Res* 1993; 29(3): 181-90.
26. Larsen NE, Lombard KM, Parent EG, Balazs EA. Effect of hylan on cartilage and chondrocyte cultures. *J Orthop Res* 1992; 10(1): 23-32.
27. Armstrong S, Read R, Ghosh P. The effects of intraarticular hyaluronan on cartilage and subchondral bone changes in an ovine model of early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1994; 21(4): 680-8.
28. Abatangelo G, Botti P, Del Bue M, Gei G, et al. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs I. Biochemical results. *Clin Orthop* 1989 (241): 278-85.
29. Scale D, Wobig M, Wolpert W. Viscosupplementation of osteoarthritic knees with hylan : a treatment schedule study. *Curr Ther Res* 1994; 55: 220-32.
30. Wobig M, Dickhut A, Maier R, Vetter G. Viscosupplementation with hylan G-F 20: a 26-week controlled trial of efficacy and safety in the osteoarthritic knee. *Clin Ther* 1998; 20(3): 410-23.
31. Wobig M, Bach G, Beks P, Dickhut A, et al. The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee : a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. *Clin Ther* 1999; 21(9): 1549-62.
32. Adams ME, Atkinson MH, Lussier AJ, Schulz JJ, et al. The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc) in the treatment of osteoarthritis of the knee : a Canadian multi-center trial comparing hylan G-F 20 alone, hylan G-F 20 with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and NSAIDs alone. *Osteoarthritis Cartilage* 1995; 3(4): 213-25.
33. Lussier A, Cividino AA, McFarlane CA, Olszynski WP, Potashner WJ, De Medicis R. Viscosupplementation with hylan for the treatment of osteoarthritis: findings from clinical practice in Canada. *J Rheumatol* 1996; 23(9): 1579-85.
34. Adams M. Viscosupplementation as an alternative to conventional treatment for the management of osteoarthritis of the knee. *J Clin Rheumatol* 1999; 5: S18-S23.

## RISEDRONATE: A NEW DRUG FOR OSTEOPOROSIS AND PAGET'S DISEASE

Suvara K. Wattanapitayakul<sup>1</sup>, Srichan Phornchirasilp<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University,

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

### ABSTRACT

Risedronate is a pyridinyl bisphosphonate that has been recently approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis, glucocorticoid-induced osteoporosis, and for the treatment of Paget's disease of the bone. Risedronate inhibits osteoclast-mediated bone resorption and modulates bone metabolism. The osteoporosis therapy clinical trials for risedronate demonstrated significant reductions in vertebral fractures and risk of new vertebral fractures within one year of treatment. Risedronate is generally well tolerated in most patients including patients with gastrointestinal disease. The overall side effects were comparable to placebo. Risedronate should not be administered in patients with hypocalcemia, known allergy to risedronate or any component of this product, or an inability to stand or sit upright for at least 30 minutes. It is not recommended to use in patients with severe kidney disease. Bisphosphonates have been associated with gastrointestinal disorders, such as dysphagia, esophagitis, and esophageal or gastric ulcers. Patients should be advised that taking the drug according to the instructions is important to minimize the risk of these adverse events. Additionally, patients should receive supplemental calcium and vitamin D if dietary intake is inadequate or plasma concentrations are below normal levels. No specific drug-drug interaction studies were performed but calcium/antacids/divalent cations/food may interfere with the absorption of risedronate and should be taken at a different time of the day. In summary, risedronate is an effective bisphosphonate for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis that is now becoming a major public health issue due to an increase in aging population.

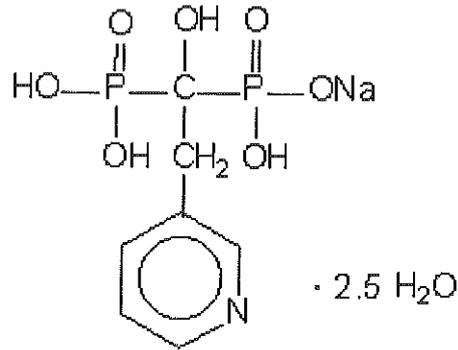
**Key words:** risedronate, bisphosphonates, osteoporosis, glucocorticoid, Paget's disease

---

Address correspondence and reprint requests to: Suvara K. Wattanapitayakul, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Sukumvit Road, Bangkok 10110, Thailand.

## บทนำ

Risedronate เป็นยาในกลุ่ม pyridinyl bisphosphonate (รูปที่ 1) ที่มีข้อบ่งใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมในกระดูก เช่น โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) และ Paget's disease<sup>1</sup> โรคกระดูกพรุนมีลักษณะสำคัญคือกระดูกเป็นโพรง เพราะ มีเนื้อกระดูกต่ำกว่าปกติ (low bone mass) มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก และมีอัตรากระดูกแตกหรือหัก (fractures) เพิ่มขึ้น โรคกระดูกพรุนเกิดได้กับผู้สูงอายุทั้งชายและหญิง แต่จะพบมากในสตรีวัยหลังหมดประจำเดือน เนื่องจากมีระดับเอสโตรเจนต่ำลง นอกจากนี้โรคกระดูกพรุนยังเกิดได้จากความผิดปกติของฮอร์โมนบางชนิด การใช้ยาบางชนิด เช่น สเตียรอยด์ และการขาดวิตามินดี โดยปกติแล้วการสร้างและการสลายตัวของกระดูก มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิด คือกระดูกเก่าจะสลายไปและมีกระดูกที่สร้างขึ้นใหม่มาแทนที่ แต่เมื่อมีอัตราการสลายกระดูกเกิดขึ้นมากกว่าการสร้างก็จะเป็นผลให้มีการสูญเสียกระดูกและนำไปสู่การเกิดกระดูกแตกหรือหักได้ ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีการประมาณว่าสตรีวัยหมดประจำเดือนที่มีอายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไปประมาณร้อยละ 54 จะมีประสบการณ์เกี่ยวกับกระดูกแตกหรือหักอันเนื่องมาจากโรคกระดูกพรุน<sup>2</sup> หลังจากการเกิดกระดูกแตกหรือหักครั้งแรก ความเสี่ยงของการเกิดกระดูกแตกหักจะเพิ่มขึ้นอีก 5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรกลุ่มที่ไม่มีอาการโรคกระดูกพรุน<sup>3</sup> เนื่องจากโรคกระดูกพรุน เมื่อเกิดขึ้นกับผู้สูงอายุจะมี



รูปที่ 1. โครงสร้างโมเลกุลของ risedronate ( $C_7H_{10}NO_7P_2Na \cdot 2.5 H_2O$ , MW 350.13)

อาการแทรกซ้อนเกิดขึ้นได้ง่าย ทำให้มีค่ารักษาพยาบาลสูงอันเป็นผลเนื่องมาจากกระดูกแตกหรือหัก ทั้งยังเกี่ยวข้องกับคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยอีกด้วย ดังนั้นหลักการรักษาโรคกระดูกพรุนคือการลดความเสี่ยงของการเกิดกระดูกแตกหรือหัก<sup>4</sup> โดยการลดการสูญเสียความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density, BMD) และการลดปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ

Paget's disease of bone เป็นความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึม ของกระดูกที่พบมากเป็นอันดับสองรองจากโรคกระดูกพรุน มักเกิดกับผู้ชายมากกว่าผู้หญิง และพบมากในประชากรที่มีเชื้อสายเป็นชาวยุโรป<sup>5</sup> โรคนี้เป็นความผิดปกติที่เรื้อรังและเกิดเฉพาะที่ และมีลักษณะตรงกันข้ามกับโรคกระดูกผุ คือมีการเพิ่มขึ้นของมวลกระดูกและกระดูกมีขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophy) มีการแทนที่ของกระดูกปกติด้วยกระดูกที่มีลักษณะผิดปกติ ซึ่งไม่แข็งแรง โครงสร้างกระดูกมีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจาก osteoclasts (เซลล์ขนาดใหญ่มีหลายนิวเคลียส เกาะติดกับผิวกระดูก มีหน้าที่

เกี่ยวกับการทำลายกระดูก) ทำหน้าที่สลายกระดูกมากผิดปกติ หลังจากนั้นมีการสร้างกระดูกใหม่โดย osteoblasts เป็นผลทำให้โครงสร้างภายในที่เคยเป็นปกติของกระดูกถูกแทนที่ด้วยการเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ โครงสร้างใหญ่ขึ้นแต่เป็นโครงสร้างที่ไม่แข็งแรง อาการทางคลินิกอาจน้อย คือ รู้สึกเหมือนไม่มีอาการ จนถึงมีอาการปวดกระดูก กระดูกเสียรูปร่าง มีพยาธิสภาพของกระดูกที่แตกหรือหักและระบบประสาทผิดปกติ ดัชนีที่ใช้กันมากทางชีวภาพที่บ่งบอกถึงสภาวะของโรคและการตอบสนองต่อการรักษา คือ serum alkaline phosphatase เป้าหมายหลักของการรักษาคือ ลดความเจ็บปวด (ถ้ามี) และป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้โดยการให้การรักษา เพื่อให้โรคเข้าสู่ระยะสงบให้เร็วที่สุด ด้วยการวัดดัชนีการสร้างและสลายกระดูก (bone turnover) และ ระดับ serum alkaline phosphatase<sup>6</sup>

#### ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

Risedronate สามารถลดอัตราการสร้างและสลายกระดูก (bone turnover) และลดการสลายกระดูกในบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของกระดูก จากการทดลองในสัตว์ทดลองที่ตัดรังไข่แล้ว พบว่า risedronate มีผลยับยั้ง bone resorption และลด bone turnover rate<sup>7-10</sup>

#### กลไกการออกฤทธิ์

ยังไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์ที่แน่นอนของ bisphosphonates ในการยับยั้งการสลายกระดูก ผลการศึกษาที่

ผ่านมา พบว่า bisphosphonates ยับยั้ง bone resorption ได้โดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณขอบที่ไม่เรียบของ osteoclasts ทำให้การซึมผ่านของแคลเซียมและอออนอื่น ๆ มีมากขึ้น<sup>5,11</sup> คาดว่า bisphosphonates มีผลยับยั้งการปลดปล่อยแคลเซียมในกระดูกโดยจับกับผลึก hydroxyapatite (รูปแบบหนึ่งของแคลเซียมฟอสเฟต ที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของกระดูก การที่มี bone resorption ลดลงมีส่วนช่วยให้มีการรักษาสมดุลย์ของปริมาณแคลเซียมและแร่ธาตุในกระดูก (bone minerals)<sup>5,11</sup>

คาดว่ากลไกการยับยั้งหน้าที่ของ osteoclast ในการสลายกระดูก ของยาในกลุ่ม bisphosphonates อาจไม่ได้เหมือนกันเสมอไป พบว่า bisphosphonates ที่ไม่มีไนโตรเจนในโมเลกุลเช่น clodronate อาจเข้าไปจับกับ nonhydrolyzable analogues ของ ATP ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกสลายกระดูก สำหรับ bisphosphonates ที่มีไนโตรเจน อยู่ในโมเลกุลเช่น Risedronate จะไม่จับกับส่วนของ ATP แต่คาดว่าน่าจะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็น ใน mevalonate pathway ซึ่งจำเป็นต่อการเกิด prenylation ของ signalling proteins ที่สำคัญ<sup>12,13</sup> มีผลลด bone turnover โดยยับยั้งการเกิด resorption ของ osteoclasts การทดลองที่สนับสนุนข้อสมมุติฐานดังกล่าวของ Luckman และคณะ ที่พบว่า ฤทธิ์ของ bisphosphonates ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบลดลง เมื่อเติม intermediates ของ mevalonate pathway<sup>13</sup> นอกจากนี้ยังเชื่อว่า Risedronate ยับยั้ง post-translational

prenylation ของโปรตีน เช่น guanosine 5'-triphosphate binding protein Ras ทำให้โครงสร้างและการทำงานของ osteoclasts เสียไป และอาจเป็นผลทำให้เกิด apoptosis ของ osteoclast<sup>14,15</sup> ผลการศึกษาทั้งภายในและภายนอกร่างกายยังแสดงให้เห็นว่า Risedronate เป็นยาที่มีความแรงสูงในการทำให้เกิด apoptosis ของ osteoclast<sup>14</sup>

### การศึกษาทางคลินิก

ผลการศึกษาทางคลินิกในระยะที่ 3 จำนวน 11 ครั้ง ถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของ Risedronate ในผู้ป่วยจำนวนโดยรวม 16,000 ราย จากสถานพยาบาลกว่า 300 แห่งใน ยุโรป อเมริกาเหนือ และออสเตรเลีย โดยที่ศึกษากับผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน<sup>15-17</sup> ในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนเนื่องจากยาสเตียรอยด์<sup>18-20</sup> และในผู้ป่วยโรค Paget's disease<sup>21-22</sup> สรุปได้ดังนี้

### การรักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน

การใช้ risedronate มีผลช่วยลดอัตราการสร้างและสลายกระดูก (bone turnover) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดโรคกระดูกพรุน การศึกษาเชิงคลินิกพบว่า การใช้ risedronate ในขนาด 5 มก./วัน ในสตรีวัยหมดประจำเดือน มีผลลดอัตราการสร้างและสลายกระดูก โดยวัดจากดัชนีทางชีวภาพ ได้แก่ urinary deoxypyridinoline/creatinine ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำหรับการสลายกระดูก มีค่าลดลง 20-40% ภายใน 1 เดือน และ bone specific alkaline

phosphatase ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้สำหรับการสร้างกระดูก มีค่าลดลง 18-39% ภายในเวลา 3 เดือน ส่วนตัวบ่งชี้ของการสร้างและสลายกระดูก (bone turnover markers) มีค่าลดลงมากที่สุดถึง 28-70% ภายในเวลา 6 เดือนและคงอยู่เป็นเวลา 3 ปี

จากการศึกษาประสิทธิภาพของยา risedronate ขนาดวันละ 5 มก. ในสตรีวัยหมดประจำเดือนจำนวนเกือบ 4,000 คน ซึ่งเป็นการศึกษาแบบ randomized, placebo controlled, double-blind study ในประชากรสองกลุ่มใหญ่ คือ ในยุโรป-ออสเตรเลีย<sup>15</sup> และในทวีปอเมริกาเหนือ<sup>16</sup> ผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการศึกษาคั้งนี้ถูกคัดเลือกตามหลักฐานการถ่ายภาพรังสีของกระดูกที่แตกหรือหัก โดยมีจำนวนครั้งเฉลี่ยของการเกิดกระดูกแตกหรือหักเท่ากับ 4 ในกลุ่ม ยุโรป-ออสเตรเลีย และเท่ากับ 2.5 ในกลุ่ม ทวีปอเมริกาเหนือ ผู้ป่วยทุกคนได้รับแคลเซียมเสริมวันละ 1000 มก. ในผู้ป่วยที่มีระดับวิตามินดีต่ำ (เท่ากับหรือต่ำกว่า 40 nmol/mL) จะได้รับวิตามินดีเสริมวันละ 500 IU ผลการศึกษาหลังให้ยาติดต่อกันนาน 3 ปีคือ 1) Risedronate มีผลลดการเกิดกระดูกหักลง 65% ภายในเวลา 1 ปี และลดลง 41% หลังจากได้รับยาภายในเวลา 3 ปี ในกลุ่มเสี่ยงที่มีการเกิดกระดูกหักโดยเฉลี่ยเท่ากับหรือมากกว่า 2 ลดได้ถึง 74% ภายในเวลา 1 ปี เมื่อเปรียบเทียบกับสตรีที่ไม่ได้รับยา และมีอัตราเสี่ยงเฉลี่ยลดลง 39 % สำหรับ nonvertebral fractures 2) Risedronate มีผลยับยั้งการลดลงของความสูงจาก -1.1 มม./ปี เป็น -0.7 มม./ปี (ในกลุ่มยุโรปและออสเตรเลีย) และ

เปลี่ยนแปลงจาก  $-2.4$  มม./ปี เป็น  $-1.1$  มม./ปี (ในกลุ่มทวีปอเมริกาเหนือ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก และ 3) Risedronate มีผลด้านการลดลงของความหนาแน่นของกระดูก (BMD) ซึ่งการลดลงของ BMD จะเป็นปัจจัยสำคัญต่อการกำเริบของโรคกระดูกพรุน จากการศึกษาพบว่ากระดูกบริเวณที่มี BMD สูงขึ้นคือบริเวณ lumbar spine, femoral neck, femoral trochanter และ midshaft radius

#### การป้องกันโรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน<sup>23,24</sup>

การให้ risedronate 5 มก./วัน สามารถป้องกันการสูญสลายของกระดูกในสตรีที่มีอายุโดยเฉลี่ย 53 ปี ที่หมดประจำเดือนตั้งแต่ 6 เดือน ถึง 3 ปี โดยผู้ป่วยได้รับแคลเซียมเสริมวันละ 1000 มก. จากการศึกษาในระยะเวลา 2 ปี ในสตรี 383 คน พบว่าภายในเวลา 3 เดือนหลังจากที่ผู้ป่วยที่ได้รับ risedronate 5 มก./วัน มีค่า BMD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ lumbar spine, femoral neck และ femoral trochanter เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก และมีดัชนีการสลายกระดูกลดลงโดยเฉลี่ย 22-40%

#### การให้ risedronate ร่วมกับการรักษาแบบให้ฮอร์โมนทดแทน<sup>18,21</sup>

การศึกษาเปรียบเทียบการให้ risedronate 5 มก./วัน ร่วมกับเอสโตรเจนขนาด 0.625 มก./วัน เป็นระยะเวลา 1 ปี ในสตรีที่มีอายุเฉลี่ย 59 ปี จำนวน 263 คน โดยเปรียบเทียบกับการให้เอสโตรเจนอย่าง

เดียว ในสตรีจำนวน 261 คน พบว่าการให้ risedronate ร่วมด้วยมีผลเพิ่ม BMD อย่างมีนัยสำคัญในกระดูกส่วน lumbar spine, femoral neck, femoral trochanter, midshaft radius และไม่มีผลต่อ distal radius ผลการทำ bone biopsy ในสตรี 61 คน พบว่า การให้ risedronate ร่วมกับการให้เอสโตรเจนมีผลลด mineralizing surface (ตัวชี้วัด bone turnover) ลง 79% และ ลดลง 50% เมื่อให้เอสโตรเจนเพียงอย่างเดียว

#### การรักษาโรคกระดูกพรุนที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของยากลุ่มสเตียรอยด์<sup>18-20</sup>

การใช้ยากลุ่มสเตียรอยด์ในระยะยาวในหญิงและชาย มักจะทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนและมีกระดูกแตกหรือหักเป็นผลตามมา พบว่าการใช้เพรดนิโซโลนในขนาดมากกว่า 7.5 มก./วัน เพิ่มความเสี่ยงของการเกิดกระดูกหักมากกว่า 2 เท่า (RR=2.27) โดยเฉพาะกระดูกโครงสร้างหลักมีความเสี่ยงเพิ่มขึ้นมากกว่า 5 เท่า (RR=5.18) มีการสูญเสียเนื้อกระดูกอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 6 เดือนแรกของการใช้สเตียรอยด์ เนื่องจากมีการสลายกระดูกมากกว่าการสร้างกระดูก จากการศึกษาเชิงคลินิกในช่วงระยะเวลา 1 ปี พบว่า risedronate (5 มก.ต่อวัน) ลดการสลายกระดูกในผู้ป่วยที่รับประทานยาสเตียรอยด์ลงได้ 55% โดยมีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการสร้างกระดูกน้อย (25-30%) ภายใน 3-6 เดือนหลังเริ่มใช้ยาในขนาด 5 มก./วัน

จากการศึกษาในช่วงระยะเวลา 1 ปี ในผู้ป่วย 2 กลุ่ม จำนวน 228 คน และ 290 คนที่ได้รับยาเพรดนิโซโลนหรือยากลุ่ม

สเตียรอยด์ชนิดอื่นที่เทียบเท่ากับเพรดนิโซโลนในขนาด วันละ 7.5 มก. พบว่าการให้ risedronate 5 มก./วัน มีผลเพิ่ม BMD อย่างมีนัยสำคัญที่กระดูกบริเวณ lumbar spine (2.9%) และ femoral neck (1.8%) นอกจากนี้ยังมีผลลดอัตราการเกิดกระดูกแตกหรือหักลง 70% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอกภายใน 1 ปี

#### การรักษา Paget's disease<sup>21-22</sup>

ในผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วย risedronate ในขนาด 30 มก./วัน เป็นเวลา 2 เดือน พบหลักฐานการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของการสร้างกระดูก (ใช้ serum alkaline phosphatase เป็นตัวบ่งชี้) และการสลายกระดูก (ใช้ urinary hydroxyproline/creatinine และ deoxypyridinoline/creatinine เป็นตัวบ่งชี้) จากการติดตามผลในระยะ 6 เดือนหลังใช้ยา พบว่าการรักษาด้วย risedronate มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกให้เป็นปกติมากขึ้น การสลายกระดูกที่เป็น appendicular และ axial ลดลง แต่ไม่มีผลต่อกระดูกที่ขา พบว่าผู้ป่วย 9 ใน 16 คน มีรอยโรคบริเวณที่กระดูกสลายดีขึ้น และไม่พบว่ามีกระดูกแตกหรือหักเพิ่มขึ้น

การศึกษาในผู้ป่วยชายจำนวน 120 คน และสตรีจำนวน 65 คน ที่มีอาการของ Paget's disease ในขั้นปานกลางถึงรุนแรง โดยมีระดับ serum alkaline phosphatase เป็นสองเท่าหรือมากกว่าระดับปกติ เมื่อผู้ป่วยได้รับ risedronate 30 มก./วัน เป็นเวลา 2 เดือน หรือได้รับ etidronate (Didronel<sup>®</sup>, เป็นยาในกลุ่ม bisphos-

phonate เช่นเดียวกัน) ในขนาด 400 มก./วัน เป็นเวลา 6 เดือน จากการประเมินผลที่ระยะเวลา 3 เดือนหลังให้ยา พบว่า 77% ของผู้ป่วยที่ได้รับ risedronate มีระดับ serum alkaline phosphatase เป็นปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับ 10.5% ของผู้ป่วยที่ได้รับ etidronate เมื่อประเมินผลการรักษาอีกครั้งในเดือนที่ 16 หลังให้ยา พบว่า 53% ของผู้ป่วยที่ได้รับ risedronate ยังอยู่ในระยะสงบของโรค เมื่อเทียบกับ 14% ของผู้ป่วยที่ได้รับ etidronate

#### เภสัชจลนศาสตร์

##### การดูดซึม<sup>23,25</sup>

ยาที่ให้โดยการรับประทานสามารถดูดซึมได้รวดเร็ว ( $T_{max} \sim 1$  ชม.) ตลอดทางเดินอาหารส่วนต้นและไม่ขึ้นกับขนาดของยา เมื่อรับประทานอย่างต่อเนื่องทุกวัน ระดับยาในเลือดจะคงที่ภายใน 57 วัน โดยมีค่าชีวประสิทธิผล (bioavailability) เฉลี่ย 0.63% และเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับการให้ยาในรูปสารละลาย นอกจากนี้ อาหารมีผลต่อการดูดซึมยา เมื่อให้ยาในขนาด 30 มก. ก่อนอาหารเช้าครึ่งชั่วโมง การดูดซึมยาลดลงประมาณ 55% (เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ยาในขณะที่อดอาหารเป็นเวลา 10 ชม. ก่อนให้ยา หรือเป็นเวลา 4 ชม. หลังให้ยา) แต่ระดับยาในเลือดยังคงสูงเพียงพอที่จะให้ผลการรักษาทางคลินิก ส่วนการให้ยาก่อนอาหารเช้าหนึ่งชั่วโมง การดูดซึมลดลงประมาณ 30% พบว่ายาจะถูกดูดซึมได้เท่ากันไม่ว่าจะให้ยาก่อนอาหารเช้าครึ่งชั่วโมง หรือหลังอาหาร 2 ชม. ดังนั้นการใช้ยาให้

เกิดประสิทธิผลจึงควรให้ยาก่อนอาหารเช้าอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงหรือหลังอาหาร 2 ชม.

#### การกระจายตัว<sup>23</sup>

การศึกษาในคนพบว่ามีความเฉลียวคงที่ของปริมาตรการกระจายตัว (mean steady-state volume of distribution) เท่ากับ 6.3 ลิตร/กก. และยาจับกับโปรตีนในพลาสมาประมาณ 24% จากการศึกษาในหนูขาวและสุนัขพบว่ายาที่ดูดซึมเข้ากระแสเลือดประมาณ 60% กระจายตัวไปที่กระดูก ยาที่เหลือจะถูกขับออกทางปัสสาวะ ยาสะสมในเนื้อเยื่ออ่อนประมาณ 0.001% ถึง 0.01%.

#### เมตาบอลิซึม<sup>23,25</sup>

ยังไม่มีหลักฐานว่ายานี้ผ่าน systemic metabolism ผลจากการศึกษาในหนูขาวสุนัข และตัวมนุษย์ที่แยกออกมาทดสอบทางห้องปฏิบัติการ พบว่ายานี้ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับ

นอกจากนี้ยังไม่พบว่า risedronate มีผลทำให้เกิดการเหนียวนาหรือยับยั้งสมรรถนะของเอนไซม์ในตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบ Cytochrome P450

#### การกำจัดยาออกจากร่างกาย<sup>23,27</sup>

ประมาณครึ่งหนึ่งของยาที่ดูดซึมจะถูกขับออกทางปัสสาวะภายใน 24 ชม. และตรวจพบยาในปัสสาวะ 85% ภายใน 28 วัน หลังจากให้ยาในรูปยาเม็ด การขจัดยาทางไต (renal clearance) มีค่า 105 มล./นาที (CV = 34%) และมีค่าเฉลี่ยวของการขจัดยาโดยรวมคือ 122 มล./นาที (CV = 19%) การขจัดยาทางไตไม่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้น

ของยาในเลือด แต่จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ creatinine clearance ยาส่วนที่ไม่ดูดซึมจะถูกขับออกในรูปแบบเดิมทางอุจจาระ ความสัมพันธ์ของระดับยาในซีรัมกับเวลาจะเป็นแบบ multiphasic โดยมีค่าครึ่งชีวิตในช่วงแรกเป็น 1.5 ชม. และมีค่าครึ่งชีวิตสุดท้ายที่ได้จากการคำนวณเป็น 480 ชม. ซึ่งถือว่าเป็นค่าแสดงการแยกตัวของยาออกจากกระดูก

#### กลุ่มประชากรเฉพาะ<sup>23</sup>

ยังไม่มีการศึกษาทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ในผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 18 ปี ค่าชีวประสิทธิผลและเภสัชจลนศาสตร์ ไม่แตกต่างกันในหญิงและชาย เมื่อให้ยาในรูปแบบรับประทาน รวมทั้งในผู้มีอายุมากกว่า 60 ปี เมื่อเปรียบเทียบกับผู้อ่อนวัยกว่า ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องปรับขนาดของยา

#### รูปแบบยาและวิธีใช้ยา<sup>23,28</sup>

จากการศึกษาหากรูปแบบยาที่เหมาะสมของ risedronate พบว่ายามีเคลือบด้วยฟิล์มเซลลูโลสมี esophageal transit ที่ดีกว่ายาในรูปแคปซูล ทางบริษัทผู้ผลิตจึงผลิตขึ้นในรูปยาเม็ดรับประทานเคลือบฟิล์มขนาด 5 มก. (สีเหลือง) และ 30 มก. (สีขาว) ควรเก็บยาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30 °C

ควรรับประทานยา risedronate วันละครั้งในช่วง 30 นาทีก่อนอาหารเช้าแรกของวัน หรือหลังรับประทานอาหารเช้าได้ 2 ชั่วโมงและเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาทีก่อนเข้านอน ผู้ป่วยควรรับประทานยาพร้อมน้ำดื่ม 1 แก้ว (ประมาณ 120 มล.) ในขณะที่อยู่ในท่านั่งหรือยืน และไม่ควรรนอน

เอนราบบลงภายใน 30 นาทีแรกหลังรับประทานยา ผู้ป่วยควรได้รับแคลเซียมและวิตามินดีเสริมในกรณีที่ขาดสารเหล่านี้ ในกรณีที่ผู้ป่วยจำเป็นต้องรับประทานยาที่มีองค์ประกอบของแคลเซียม อลูมิเนียม และแมกนีเซียม ควรแยกรับประทานยาเหล่านี้ในเวลาอื่นที่ไม่ใช่เวลาเดียวกับ risedronate

### ข้อบ่งใช้ และขนาดยา<sup>22</sup>

1. ใช้รักษาหรือป้องกันโรคกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือน โดยใช้ยาในขนาด 5 มก./วัน
2. ใช้รักษาหรือป้องกันโรคกระดูกพรุนในหญิงและชายที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของการใช้ยากลุ่มสเตียรอยด์ในระยะยาว ใช้ยาในขนาด 5 มก./วัน
3. ใช้รักษา Paget's Disease ขนาดยาที่แนะนำคือ 30 มก./วัน เป็นเวลาติดต่อกันอย่างน้อย 2 เดือน ควรมีการติดตามผลการรักษาและอาจมีการใช้ยาอีกหลังจากพบว่าอาการของโรคกลับมาใหม่โดยใช้ขนาดยาและระยะเวลาการรักษาเช่นเดียวกับการรักษาในระยะเริ่มต้น

### ปฏิกิริยาสัมพันธ์กับยาอื่น<sup>22,23,25</sup>

ยังไม่มีการศึกษาถึงการเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์กับยาตัวใดตัวหนึ่งโดยเฉพาะ แต่ risedronate ไม่ถูก metabolize ภายในร่างกาย และไม่เหนี่ยวนำหรือยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 ในตับ ทำให้คาดการณ์ว่ามีความเสี่ยงน้อยที่จะเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์กับยาอื่น

การใช้ร่วมกับแคลเซียม/ยาลดกรด/ยาที่มี divalent cations จะทำให้การ

ดูดซึม risedronate ลดลง อาจใช้ risedronate ร่วมกับการรักษาด้วยฮอร์โมน (เอสโตรเจน) ได้เมื่อพิจารณาเห็นสมควร

สามารถให้ risedronate ร่วมกับยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ได้โดยไม่มีผลทำให้ฤทธิ์ข้างเคียงที่เกิดจากสเตียรอยด์มีมากขึ้น ทั้งนี้เป็นผลจากการศึกษาทางคลินิกในระยะ 3 ที่มีผู้ป่วยเหล่านี้รวมอยู่ด้วย พบว่า การใช้ยานี้ร่วมกับแอสไพรินและยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์อื่น ๆ ไม่ทำให้ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นกับทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น (ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์เกิดขึ้น 24.5% เมื่อใช้ยาร่วมกัน เมื่อเทียบกับ 24.8% เมื่อใช้แอสไพรินหรือ NSAIDs อย่างเดียว) อัตราการเกิดอาการข้างเคียงเกี่ยวกับทางเดินอาหารในผู้ใช้ยา risedronate ไม่แตกต่างไปจากกลุ่มผู้ใช้ H<sub>2</sub> blockers และ/หรือ proton pump inhibitors (21% ของผู้ที่เข้าร่วมในการศึกษาเชิงคลินิกระยะ 3 จำนวนกว่า 5,700 คน)

### ผลต่อการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่ายากลุ่ม bisphosphonates มีผลรบกวนการใช้สารสร้างภาพในกระดูก (bone-imaging agents) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของ risedronate โดยเฉพาะ

### ผลการศึกษาทางพิษวิทยา<sup>23</sup>

ศึกษาในสัตว์ทดลองโดยเปรียบเทียบขนาดของยาเป็นจำนวนเท่าของขนาด 5 มก.ที่ใช้ในมนุษย์ โดยเปรียบเทียบจากพื้น

ที่ผิวในหน่วย มก./ดร.ม. อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดถึงความสัมพันธ์ของการเกิดพิษในสัตว์ทดลองกับการเกิดพิษในมนุษย์

#### ผลต่อตัวอ่อนในครรภ์

พบว่า หนูขาวขณะตั้งครรภ์ที่ได้รับยาโดยการให้ทางปากในขนาด 7.1 และ 16 มก./กก./วัน (~12-30 เท่าของขนาดยา 5 มก.) ให้ลูกที่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น กลุ่มหนูขาวที่ได้รับยาในขนาดวันละ 80 มก./กก. (~162 เท่า) กลับมีผลทำให้หนูแรกเกิดมีน้ำหนักลดลง พบว่าหนูขาวขณะตั้งครรภ์ที่ได้รับยาในขนาด 7.1 มก./กก. (~12 เท่า) มีการเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญของตัวอ่อนในครรภ์ที่มีการสร้างกระดูกที่สันอกไม่สมบูรณ์ มีหลักฐานของการเกิดร่องแต่กำเนิดทางแนวกลางของเพดานปาก (cleft palate) ในตัวอ่อนของหนูเพศเมียเมื่อได้รับยาในขนาดตั้งครรภ์ในขนาด  $\geq 3.2$  มก./กก./วัน (6 เท่าของขนาด 5 มก. ที่ใช้ในมนุษย์) ไม่พบความผิดปกติของการสร้างกระดูกในตัวอ่อนของกระต่ายขณะตั้งครรภ์ที่ได้รับยาในขนาด 10 มก./กก./วัน (ประมาณ 42 เท่าของขนาดยา 5 มก.) แต่พบว่ามีจำนวน 14 ราย มีแท้ง 1 ราย และคลอดก่อนกำหนด 1 ราย

#### ผลต่อระบบสืบพันธุ์

เมื่อให้ยาในรูปปรับประทานแก่หนูเพศเมีย พบว่ายานี้ในขนาด 16 มก./กก./วัน (30 เท่าของขนาด 5 มก.) มีผลยับยั้งการตกไข่ พบว่ามีการลดการฝังตัวของตัวอ่อนในครรภ์เมื่อหนูเพศเมียได้รับยาในขนาด  $\geq$

7 มก./กก./วัน (12 เท่าของขนาด 5 มก.) ส่วนในหนูเพศผู้พบว่า ยาขนาด 40 มก./กก./วัน มีผลทำให้เกิดการอักเสบและฝ่อของลูกอัณฑะและกลุ่มหลอดนำอสุจิ (testicular and epididymal atrophy and inflammation) การฝ่อของอัณฑะก็พบได้ในหนูเพศผู้ที่ได้รับยาทางปากเป็นเวลา 13 สัปดาห์ ในขนาด 16 มก./กก./วัน จากการศึกษาในสุนัขพบว่า มีการยับยั้งการสร้างอสุจิหลังจากให้ยาเป็นเวลา 13 สัปดาห์ ในขนาด 8 มก./กก./วัน ความรุนแรงของความผิดปกติเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นตามขนาดยาที่เพิ่มขึ้น และระยะเวลาการให้ยาที่ยาวนานขึ้น

#### ผลการเป็นสารก่อมะเร็ง

ไม่พบว่ามีเนื้องอกเกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูขาวเพศเมียที่ได้รับยารisedronate ในขนาด 24 มก./กก./วัน (~71 เท่าของขนาด 5 มก.) เป็นเวลา 104 สัปดาห์ ส่วนในหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับยาในขนาดเดียวกันพบความเป็นพิษสูง จึงหยุดการศึกษาในสัปดาห์ที่ 94 และไม่ได้นำผลการศึกษาไปใช้ในทางสถิติ ส่วนการศึกษาในหนูถีบจักร ทั้งเพศผู้และเพศเมียเป็นเวลา 80 สัปดาห์ โดยให้ยาในรูปปรับประทานในขนาด 32 มก./กก./วัน (~6.4 เท่า) ไม่พบว่าการเกิดเนื้องอกที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของยาอย่างมีนัยสำคัญ

#### ผลต่อการกลายพันธุ์

ไม่พบว่ายารisedronate ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อยีนด้วยการทดสอบการก่อกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย *Salmonella* และ *E.*

*coli* การทดสอบในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่เรียกว่า CHO/HGPRT assay และการทดสอบในเซลล์ตับและเซลล์ไขกระดูกของหนู แต่พบความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ CHO เมื่อให้ risedronate ในขนาดที่เป็นพิษ คือ ความเข้มข้นมากกว่า 675 ไมโครกรัม/มล. (เซลล์รอดชีวิต 6-7%) แต่เมื่อลดขนาดยาลงในช่วงที่มีเซลล์รอดชีวิตประมาณ 29% ไม่พบความเสียหายที่เกิดกับโครโมโซม

### ข้อห้ามใช้

ผู้ที่มีระดับแคลเซียมในเลือดต่ำ (hypocalcemia) ผู้ที่แพ้ส่วนประกอบในยานี้ หรือไม่สามารถที่จะยืนหรือนั่งตรงได้อย่างน้อย 30 นาที

### ข้อควรระวัง<sup>23-24</sup>

โดยทั่วไปแล้ว ควรรักษาผู้ที่มีระดับแคลเซียมในเลือดต่ำ (hypocalcemia) หรือมีความผิดปกติในกระบวนการเมตาบอลิซึมของแร่ธาตุ ก่อนที่จะใช้ยา risedronate การได้รับแคลเซียมและวิตามินดีในปริมาณเพียงพอเป็นปัจจัยสำคัญในการรักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยกลุ่ม Paget's disease ที่มีการสร้างและสลายกระดูกในอัตราที่สูง นอกจากนี้ไม่ควรใช้ risedronate ในผู้ป่วยโรคไตรุนแรง (มีค่า creatinine clearance น้อยกว่า 30 มล./นาที)

ยาในกลุ่ม bisphosphonates มีความเกี่ยวเนื่องกับการเกิดความผิดปกติทางเดินอาหาร เช่น การกลืนลำบาก หลอดอาหารอักเสบ และ แผลที่หลอดอาหารหรือกระเพาะอาหาร ความเกี่ยวข้องของการใช้ยา

ในกลุ่มนี้และอาการต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วนั้น เป็นผลมาจากรายงานการศึกษาในระยะพรีคลินิก ทั้งนี้รวมถึงยาตัวใหม่ risedronate ด้วย<sup>2</sup> ดังนั้นผู้ป่วยจึงควรใช้ยาตามคำแนะนำในฉลากยาเพื่อลดอาการข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น โดยผู้ป่วยควรรับประทานยาพร้อมกับน้ำดื่มในปริมาณพอเพียง (ประมาณ 120 มล.) เพื่อที่จะช่วยในการนำส่งยาให้ไปถึงกระเพาะอาหาร และไม่ควรเอนนอนภายใน 30 นาทีหลังจากรับประทานยา

### ในสตรีมีครรภ์

ยังไม่มีการศึกษาอย่างพอเพียงสำหรับการใช้ risedronate ในสตรีมีครรภ์ แต่ผลจากการศึกษาในสัตว์ทดลองดังกล่าวข้างต้น ทำให้ต้องพิจารณาอย่างระมัดระวัง โดยถือเอาผลประโยชน์สูงสุดแก่ผู้ป่วย

### ในสตรีให้นมบุตร

ตรวจพบยา risedronate ในน้ำนมหนูภายใน 24 ชม. หลังให้ยา แต่ยังไม่มีการศึกษาว่ามีการขับยานี้ออกทางน้ำนมมนุษย์ เนื่องจากยาหลายชนิดถูกขับออกทางน้ำนม และเนื่องจากยากลุ่มนี้มีความเป็นไปได้อย่างสูงที่จะก่อให้เกิดฤทธิ์ข้างเคียงต่อทารก ดังนั้นในการใช้ยานี้ ควรพิจารณาหยุดการให้นมบุตรหรือหยุดการให้ยา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประโยชน์สูงสุดที่ผู้ป่วยจะได้รับ

### ผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่อง

เนื่องจากยาถูกขับออกทางไตในรูปเต็ม จึงไม่ควรให้ยานี้แก่ผู้ป่วยโรคไตรุนแรง ที่มีค่า creatinine clearance น้อยกว่า 30

มล./นาที่ ผู้ป่วยโรคไตที่มีค่า creatinine clearance ประมาณ 30 มล./นาที่ ประสิทธิภาพการกำจัดยาออกทางไตลดลง 70% แต่ไม่มีความจำเป็นต้องปรับขนาดของยา

### ผู้ป่วยโรคตับ

ยังไม่มีการศึกษาความปลอดภัยและประสิทธิผลของยาในผู้ป่วยโรคตับ

### ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์<sup>23,29</sup>

จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนจำนวนมากกว่า 5,700 คน เป็นระยะเวลาสูงสุด 3 ปี โดยทั่วไปผู้ได้รับยามีอาการไม่พึงประสงค์ไม่รุนแรงในทุกกระบบของร่างกาย และเกิดขึ้นในอัตราที่ใกล้เคียงกับผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอก ส่วนอัตราการเกิดฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ที่ทำให้ผู้ป่วยต้องหยุดยา คือ 14.4% ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาหลอก และ 13.5% ในผู้ป่วยที่ได้รับ risedronate

ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ พบว่าผู้ป่วยมีระดับแคลเซียมและฟอสฟอรัสในซีรัมต่ำลงโดยเฉลี่ย 0.8% และ 2.7% ตามลำดับจากการตรวจผู้ป่วยที่มีโรคทางเดินอาหารอยู่ก่อนเข้ารับการรักษาด้วย risedronate (75 คน) หรือยาหลอก (75 คน) พบว่า สัดส่วนของผู้ที่มีหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และ duodenal mucosa เป็นปกตินั้น ไม่แตกต่างกันในผู้ได้รับยา risedronate (21 %) หรือยาหลอก (20%) มีรายงานอาการทางคลินิกที่สำคัญ เช่น กระเพาะทะลุ แผลในกระเพาะ หรือเลือดออกในทางเดินอาหารในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับ risedronate ในอัตราร้อยละ 39 และในกลุ่มที่ได้รับยาหลอกในอัตราร้อยละ 51 จึงเชื่อว่าผลต่อทางเดิน

อาหารคงมิได้เกิดจากยา นอกจากนี้ยังมีอีกการศึกษาหนึ่งที่ทำในสตรีวัยหมดประจำเดือนเพื่อเปรียบเทียบ risedronate (ขนาด 5 มก./วัน, n=255) กับยาในกลุ่มเดียวกันคือ alendronate (ขนาด 10 มก./วัน, n=260) โดยการส่องกล้องทางเดินอาหารในวันที่ 8 และ 15 หลังจากให้ยา พบแผลที่หลอดอาหาร 3 ราย และแผลที่ duodenum 1 รายในกลุ่มผู้ที่ใช้ยา alendronate ส่วนผู้ป่วยที่ใช้ยา risedronate ไม่พบแผลที่หลอดอาหาร แต่พบแผลที่ duodenum 1 ราย

ในผู้ป่วย Paget's disease จำนวน 392 คน ไม่พบความแตกต่างของลักษณะอาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับยา risedronate หรือ etidronate มีผู้ป่วยจำนวนร้อยละ 6.6 ถอนตัวจากการรักษาเนื่องจากอาการข้างเคียงของยา risedronate เมื่อเทียบกับร้อยละ 8.2 ของผู้ป่วยที่ได้รับยา etidronate นอกจากนี้ยังพบผู้ป่วย 3 รายที่ได้รับ risedronate ในขนาด 30 มก./วัน มีอาการม่านตาอักเสบอย่างเฉียบพลัน หลังจากที่ยาจากอาการอักเสบ พบว่าผู้ป่วยหนึ่งในสามคนมีอาการกลับเป็นอีกหลังได้รับ risedronate และ pamidronate (ยาในกลุ่ม bisphosphonates) อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยทั้งหมดหายจากอาการข้างเคียงนี้ได้เมื่อรักษาด้วยยากลุ่มสเตียรอยด์เฉพาะที่

### การได้รับยาเกินขนาด<sup>23</sup>

อาจพบภาวะแคลเซียมและฟอสฟอรัสต่ำในผู้ป่วยบางคนที่ได้รับยาในขนาดสูงมาก การล้างท้องอาจเป็นวิธีหนึ่งที่จะกำจัดยาที่ไม่ถูกดูดซึมออกจากร่างกาย วิธีมาตรฐานในการลดภาวะแคลเซียมต่ำ คือ

การให้แคลเซียมทางหลอดเลือดดำ จากการศึกษาในหนูขาว พบว่าขนาดยาที่ให้ครั้งเดียวที่ทำให้หนูขาวเพศเมียเสียชีวิตคือ 903 มก./กก. และ 1,703 มก./กก. ในหนูขาวเพศผู้ ส่วนในหนูถีบจักรและกระต่ายมีขนาด

4,000 มก./กก. และ 1,000 มก./กก. ตามลำดับ (ประมาณ 320 ถึง 620 เท่าของขนาดสูงสุด 30 มก. ที่แนะนำให้ใช้ในมนุษย์)

### เอกสารอ้างอิง

- Licata AA. Risedronate, a novel pyridinyl bisphosphonate for the treatment of osteoporosis and Paget's disease of bone. *Exp Opin Invest Drugs* 1999; 8: 1093-1102.
- Chrischilles EA, Butler DC, Davis CS, et al. A model of lifetime osteoporosis impact. *Arch Intern Med* 1991; 151: 2026-2032.
- Ross PD, Davis JW, Epstein RS, et al. Pre-existing fractures and bone mass predict vertebral fracture incidence in women. *Ann Intern Med* 1991; 114: 919-923.
- Cooper C, Kanis JA, Compston J. How to assess drug efficacy in osteoporosis. *Lancet* 1995; 345: 743-744.
- Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease: from the laboratory to the patient. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Parthenon, 1997:68.
- Siris ES. Goals of treatment for Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1999; 14 (Suppl 2):49-52.
- Gropp KE, Bouchard GF, Phipps RJ, et al. Risedronate dose-dependently decreases bone turnover in ovariectomized minipigs. *J Bone Miner Res* 1997; 12: S471.
- Erben RG, Phipps RJ. Longterm (12 months) risedronate treatment preserves trabecular bone mass and structure in ovariectomized rats. *Bone* 1998;23:S404.
- Phipps R, Mackey M, Raimondi K, et al. Risedronate treatment prevents ovariectomy-induced changes in bone mineral density of lumbar vertebrae in minipigs. *Osteoporos Int* 1996; 6: 257.
- Mosekilde L, Thomsen JS, Mackey MS, et al. Effects of risedronate and alendronate on loss of bone density and strength due to limb immobilization in rats. *Bone* 1998; 23: S402.
- Sato M, Grasser W, Endo N, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991; 88:2095-2105.
- Rogers MJ, Ji X, Russell GG, et al. Incorporation of bisphosphonates into adenine nucleotides by amoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J* 1994; 303:303-311.
- Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, et al. Nitrogen containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13:581-589.
- Hughes DE, Wright KR, Uy HL, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995;10:1478-1487.
- Reginster JY, Minne HW, Sorensen OH, et al. Randomised trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women established postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000; 11: 83-91.
- Harris ST, Watts NB, Genant HK, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: A randomized controlled trial. *JAMA* 1999; 282: 1344-1352.
- Harris ST, Wasnich R, Ettinger M, et al. The effect of risedronate plus estrogen compared with estrogen alone in postmenopausal women. Publish meeting abstract of the 21 st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research; 1999; Sep 30-Oct 4; St Louis, Missouri: ASBMR, 1999.
- Reid DM, Hughes RA, Laan RF, et al. Efficacy and safety of daily risedronate in the treatment of corticosteroid-induced osteoporosis in men and women: A randomized trial. European Corticosteroid-Induced Osteoporosis Treatment Study. *J Bone Miner Res* 2000;15:1006-1013.

19. Wallach S, Cohen S, Reid DM, et al. Effects of risedronate treatment on bone density and vertebral fracture in patients on corticosteroid therapy. *Calcif Tissue Int* 2000; 67: 277-285.
20. Cohen S, Levy RM, Keller M, et al. Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss. *Arthritis & Rheumatism* 1999; 42: 2309-2318.
21. Miller PD, Brown JP, Siris ES, et al. A randomized, double-blind comparison of risedronate and etidronate in the treatment of Paget's disease of bone. Paget's Risedronate/Etidronate Study Group. *Am J Med* 1999; 106: 513-20.
22. ACTONEL: Full Prescribing Information. <http://www.actonel.com/pi.html>
23. ACTONEL (risedronate sodium tablets): Global Product Monograph 02/02/2000.
24. Hooper M, Ebeling P, Roberts A, et al. Risedronate prevents bone loss in early postmenopausal women. Published meeting abstracts of the 26<sup>th</sup> European symposium; 1999; May 7-11; Maastricht: European Calcified Tissue Society, 1999.
25. Mitchell DY, Heise MA, Pallone KA, et al. The effect of dosing regimen on the pharmacokinetics of risedronate. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48: 536-542.
26. Smith B, Hu J, Schwecke W. Evaluation of the effects of risedronate on hepatic microsomal drug metabolizing enzyme activities following administration to rats for 14 days: lack of an induction response. *Drug Chem Toxicol* 1998;21:291-303.
27. Mitchell DY, St. Peter JV, Eusebio RA, et al. The effect of renal impairment on risedronate pharmacokinetics. *J Bone Miner Res* 1997;12:S344.
28. Perkins AC, Wilson CG, Frier M, et al. Esophageal transit of risedronate cellulose-coated tablet and gelatin capsule formulations. *Int J Pharm* 1999;186 (2):169-175.
29. Lanza FL, Hunt RH, Thomson ABR, et al. Endoscopic comparison of esophageal and gastroduodenal effects of risedronate and alendronate in postmenopausal women. *Gastroenterology* 2000; 119: 631-638.

## บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2542

- บัญชี ก.** คือ รายการที่มีความจำเป็นสำหรับสถานพยาบาลทุกระดับ(เป็นยาที่อยู่ใน model list of essential drugs ของ WHO และมีความจำเป็นต้องใช้ในประเทศ รวม 243 ตำยา)
- บัญชี ข.** คือ รายการที่อาจจำเป็นต้องใช้ในสถานพยาบาลบางระดับ หรือจำกัดข้อบ่งใช้สำหรับอาการ หรือโรคบางชนิดที่หายในบัญชี ก. ไม่ได้หรือไม่ได้ผล หรือเป็นยาที่ใช้แทนยาในบัญชี ก. ชั่วคราว ในกรณีที่จัดหาในบัญชียา ก. นั้นไม่ได้ รวม 116 ตำยา
- บัญชี ค.** คือ รายการที่ต้องใช้โดยผู้เชี่ยวชาญที่ได้รับมอบหมายจากผู้อำนวยการของสถานพยาบาลนั้นๆ เนื่องจากเป็นยาที่มีอันตรายถ้าใช้ไม่ถูกต้อง อาจเกิดพิษหรือเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย หรือเป็นสาเหตุให้เกิดเชื้อดื้อยาได้ง่าย รวม 18 ตำยา
- บัญชี ง.** คือ รายการยาที่อาจมีความจำเป็นต้องใช้สำหรับช่วยชีวิตผู้ป่วยบางราย แต่อาจทำให้เกิดอันตราย ต่อผู้ป่วย หรือก่อปัญหาเชื้อดื้อยาที่ร้ายแรงและ/หรือมีราคาแพงมาก การสั่งใช้ยาซึ่งต้องให้สมเหตุสมผล เกิดความคุ้มค่าสมประโยชน์จะต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยและพิจารณาโดยผู้เชี่ยวชาญที่ได้รับการฝึกอบรม ฉะนั้น ยาในบัญชียังกล่าวจะสั่งใช้ได้โดยผู้เชี่ยวชาญที่ได้รับการฝึกอบรมในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้องจากสถานฝึกอบรม หรือได้รับวุฒิมัธยมศึกษาหรือหนังสืออนุมัติจากแพทยสภาหรือทันตแพทยสภาเท่านั้น และโรงพยาบาลจะต้องมีระบบการกำกับประเมินและตรวจสอบการใช้ยา (ระบบ Drug Utilization Evaluation) โดยมีการเก็บข้อมูลการใช้เพื่อตรวจสอบในภายหลังได้
- บัญชี จ.** คือ รายการยาสำหรับใช้เฉพาะโครงการพิเศษของกระทรวง ทบวง กรม หรือเทียบเท่าที่ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการพัฒนาบัญชียาหลักแห่งชาติ

## PHYTOMEDICINE

### *Cimicifuga racemosa* : for Management of Climacteric Period

สุพัตรา ศรีไชยรัตน์<sup>1</sup> และ สุมนา ชมพูทวีป<sup>2</sup>

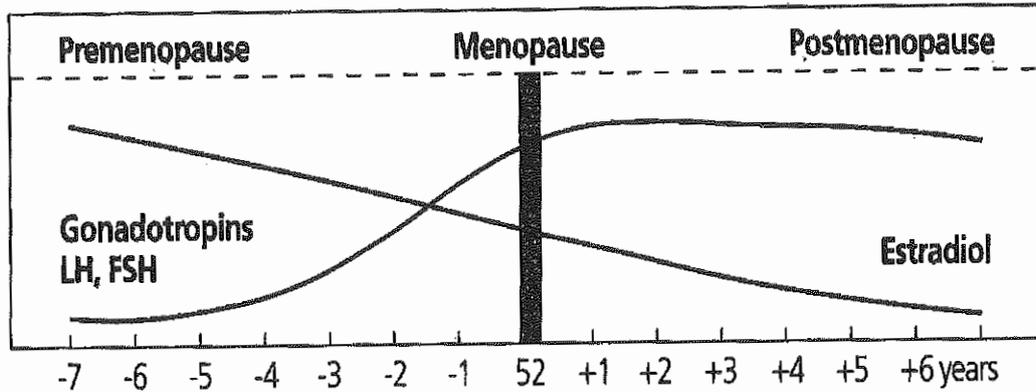
<sup>1</sup>ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังค์ กทม.10330

<sup>2</sup>ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระราม4 กทม. 10330

ปัจจุบัน สตรีที่เข้าสู่วัยหมดระดูหรือวัยหมดประจำเดือน หรือนิยมเรียกกันว่าวัยทอง มีจำนวนมากขึ้น พบว่าในปี พ.ศ. 2533 มีสตรีถึง 467 ล้านคนที่อยู่ในวัยหมดระดู โดยร้อยละ 40 ของสตรีเหล่านี้อยู่ในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว และเป็นที่ยกาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2543 ร้อยละ 76 ของสตรีวัยหมดระดูทั้งหมดจะอยู่ในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา จึงเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงและปัญหาที่พบในวัยหมดระดูกำลังเป็นเรื่องที่พบได้ทุกภูมิภาคทั่วโลก ทั้งนี้ส่วนหนึ่งเป็นผลจากอายุขัยของประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทย อายุขัยเฉลี่ยของประชากรสตรีเพิ่มจาก 68.05 ปี ในปี พ.ศ. 2523-2528 มาเป็น 71.80 ในปี พ.ศ. 2538-2543 จึงมีแนวโน้มที่สตรีจะต้องใช้ชีวิตในช่วงของวัยหมดระดูที่ยาวนานขึ้น คือประมาณ 1 ใน 3 ของช่วงอายุ<sup>1</sup> ถึงแม้ว่าสตรีในวัยหมดประจำเดือนจะไม่ต้องประสบกับปัญหาของรอบเดือนที่เคยมีมาตั้งแต่เริ่มเข้าวัยสาว แต่ปัญหาที่เกิดขึ้นในสตรีในวัยนี้ ส่วนใหญ่มักจะเกิดจากอาการที่ไม่พึงประสงค์เนื่องจากความแปรปรวนของระดับฮอร์โมนเพศ เช่น อาการร้อนวูบวาบ เหงื่อออกมากในเวลากลางคืน หัวใจเต้นแรง

และเร็ว หงุดหงิด อารมณ์แปรปรวนแปรได้ง่าย ความรู้สึกตื่นเต้นกังวล ปัญหาทางเดินปัสสาวะ ตลอดจนช่องคลอดบางและแห้ง ปัญหาทางกายและอาการหงุดหงิดทางอารมณ์ที่เรียกกันว่าเลือดจะไปลมจะมา ที่เกิดขึ้นในช่วงนี้ กลับเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อตัวสตรีวัยทองเองและคนใกล้ชิดในครอบครัว<sup>2</sup> อาการดังกล่าวเกิดขึ้นในสตรีเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งที่น่าพอใจสมควร จัดว่าเป็นระยะวัยเปลี่ยน (climacteric period)

ระยะวัยเปลี่ยนของชีวิตสตรีนับว่าเป็นช่วงหัวเลี้ยวหัวต่อของการเปลี่ยนแปลงจากวัยเจริญพันธุ์เข้าสู่วัยชรา แบ่งออกเป็น 4 ช่วงใหญ่ๆ คือ ช่วงก่อนจะหมดประจำเดือน (premenopause) เริ่มเกิดขึ้นหลังอายุ 40 ปี ระยะถัดมาเป็นช่วงที่เรียกว่าระยะวัยใกล้หมดประจำเดือน (perimenopause) ระยะนี้นานจนถึงวันที่มีประจำเดือนครั้งสุดท้าย ระยะหมดประจำเดือน (menopause) คือช่วงเวลาตั้งแต่หมดประจำเดือนไปจนประมาณ 1 ปี จากนั้นจึงเริ่มต้นเข้าสู่ระยะหลังหมดประจำเดือน (postmenopause) ซึ่งกินเวลานานถึง 15 ปีจึงเข้าสู่วัยชรา เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าการเปลี่ยนแปลงทางร่างกายและจิตใจที่เกิดขึ้นในช่วงนี้ เป็นผลมา



รูปที่ 1 ระดับฮอร์โมนที่เปลี่ยนแปลงไปตามช่วงเวลาวิกฤติของสตรี<sup>11</sup>

จากการที่ร่างกายกำลังปรับตัวสำหรับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเนื่องจากระดับฮอร์โมนที่แปรปรวน ในขณะที่ยังไม่สามารถผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนในปริมาณสูงๆได้อีกต่อไป แต่ต่อมพิทูอิทารียังคงหลั่งฮอร์โมนกระตุ้นฟอลลิเคิล (Follicle Stimulating Hormone, FSH) และ luteinizing hormone (LH) อยู่ คาดว่าระดับฮอร์โมน FSH และ LH ที่สูงขึ้นร่วมกับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนที่ลดลง (ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1) เป็นสาเหตุของอาการที่มักพบบ่อยดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาการร้อนวูบวาบ

ถึงแม้ว่าการใช้ฮอร์โมนเพศทดแทนจะมีส่วนช่วยในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวนี้ได้เป็นอย่างดี แต่ก็มีสตรีในวัยทองอีกหลายคนที่ไม่สามารถได้รับฮอร์โมนทดแทนเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว เนื่องจากฤทธิ์ข้างเคียงของฮอร์โมน เช่น ปวดศีรษะ หรือมีแนวโน้มจะเป็นมะเร็งที่เต้านม<sup>2-4</sup> นอกจากนี้ยังมีสตรีอีกหลายคนที่มีสิทธิ์ที่จะได้รับฮอร์โมนทดแทน

แทนเนื่องจากความไม่มั่นใจในความปลอดภัยของตัวยา ข้อมูลจากการสำรวจที่ทำในสตรีวัยหมดประจำเดือนจำนวน 2,500 ราย พบว่า 20% ของสตรีเหล่านี้หยุดใช้ฮอร์โมนทดแทนภายใน 9 เดือน เนื่องจากกลัวเป็นมะเร็งและไม่พอใจกับการมีประจำเดือนอีกอีก 10% ใช้ฮอร์โมนทดแทนแบบไม่ต่อเนื่อง ในขณะที่ 20-30% ไม่เคยใช้ฮอร์โมนเลย<sup>5</sup> สตรีบางคนใช้ฮอร์โมนร่วมกับยาสมุนไพร และ 70% ของสตรีเหล่านี้ไม่แจ้งให้แพทย์ทราบ<sup>6</sup>

กระแสการใช้สมุนไพรเพื่อรักษาอาการหมดประจำเดือนหรือใช้ร่วมกับฮอร์โมนทดแทนนั้นกำลังเป็นที่นิยมกันมากในต่างประเทศ ทั้งในยุโรปและอเมริกาเหนือ เช่น คานาดา และสหรัฐอเมริกา แม้แต่ในประเทศไทยเองความสนใจนำสมุนไพรพื้นบ้านมาใช้เพื่อสุขภาพกำลังอยู่ในกระแสนิยม มีสมุนไพรหลายตัวที่จัดเป็นยาและอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ เป็นที่น่าสังเกตว่า ผู้บริโภคส่วนใหญ่เข้าใจเอาเองว่าสมุนไพรนำ

จะมีความปลอดภัยกว่ายา ทั้งที่สมุนไพรเหล่านี้ก็มีตัวยาที่ออกฤทธิ์อยู่เช่นเดียวกับยา ถึงแม้ว่าสมุนไพรบางชนิด จะได้รับการยอมรับจากคณะกรรมการอาหารและยาของแต่ละประเทศโดยได้รับการจดทะเบียนเป็นยาหรืออาหารเสริมแล้วและข้อความบนฉลากก็มักจะบ่งบอกถึงสูตรยา วิธีใช้ และผู้ผลิตแล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่สามารถให้ความมั่นใจในฤทธิ์และประสิทธิผลของการรักษาได้ เนื่องจากขาดการตรวจสอบมาตรฐานถึงปริมาณที่แน่นอนของสารที่มีฤทธิ์ในสมุนไพรนั้นๆ มีสมุนไพรบางตัวที่ได้รับการแนะนำให้ใช้เพื่อบรรเทาอาการไม่สบายกายและใจในวัยวิกฤติของชีวิต นับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตของสตรีในวัยทองที่ไม่สามารถได้รับฮอร์โมนทดแทนเนื่องจากมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมหรือมดลูก

สมุนไพรจากต่างประเทศ Black Cohosh เป็นตัวหนึ่งที่ได้รับการยอมรับกันมานานหลายสิบปีว่าใช้เพื่อแก้อาการดังกล่าวได้ มีการรวบรวมผลการรักษาและรายงานถึงประสิทธิภาพของยาทางคลินิกอย่างเป็นระบบ และมีรายงานการศึกษาถึงความ เป็นพิษและกลไกการออกฤทธิ์ในสัตว์ทดลองเป็นจำนวนมาก โดยยาส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบเป็นสารสกัดที่ผ่านการตรวจสอบด้านมาตรฐานมาแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับว่าใช้บรรเทาอาการเปลี่ยนแปลงทางร่างกายและจิตใจในช่วงวัยทองได้ผล หรือสามารถนำมาใช้ร่วมกับการให้ฮอร์โมนทดแทนได้ สมุนไพรนี้เป็นผลิตภัณฑ์จากประเทศเยอรมันนี่ ซึ่งได้ผลิตเป็นยาที่มีชื่อการค้าว่า Remifemin®

### Black Cohosh (*Cimicifuga racemosa*)

มีชื่อเรียกทางพฤกษศาสตร์ว่า *Cimicifuga racemosa* และมีชื่อเรียกอื่นๆ เช่น Black snake root, Rattleroot, Rattleweed, Squaw root, Bugbane, Bugwort, Cimicifuga และ Richweed อยู่ในวงศ์ Ranunculaceae วงศ์รอง Heleboroideae เป็นพืชสูงประมาณ 1-1.5 เมตร มีใบมาก มีดอกสีขาวเป็นช่อ ยาว 30-90 ซม. มีกลีบดอก 3-8 กลีบ โดยไม่มีต่อมน้ำหวาน และหุ้มดอกไว้ด้วยกลีบเลี้ยง ดอกจะบานในเดือนกรกฎาคม ลักษณะของลำต้นใต้ดินแข็งแรง เป็นแท่งกลม เหนียวและเป็นปุ่มก้อน ส่วนของรากเป็นแท่งตรง แข็งแรง สีน้ำตาลดำ แตกหน่อจากหัวใต้ดิน หยาด มีเหลี่ยมและร่อง เมื่อผ่ารากตามขวางจะเห็นเป็นรูปลิ้นสีขาว ในขณะที่ลำต้นใต้ดินที่ผ่าตามขวางจะมีแกนในสีดำนวลรอบด้วยวงไม้ที่มีสีจางกว่า ลักษณะใบเป็นใบคู่ ใหญ่เรียบ และเป็นหยัก ปลายตัด<sup>7</sup>

ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาเป็นส่วนของลำต้นใต้ดินซึ่งมีสีดำ และรากที่ติดอยู่ ใช้ได้ทั้งสดและแห้ง โดยเก็บหัวใต้ดินหลังจากผลสุกแล้ว

### แหล่งกำเนิด

อยู่ในประเทศแคนาดาและสหรัฐอเมริกา ปลูกมากในยุโรปและเอเชียตอนเหนือ เช่น ไซบีเรีย

### ส่วนประกอบ

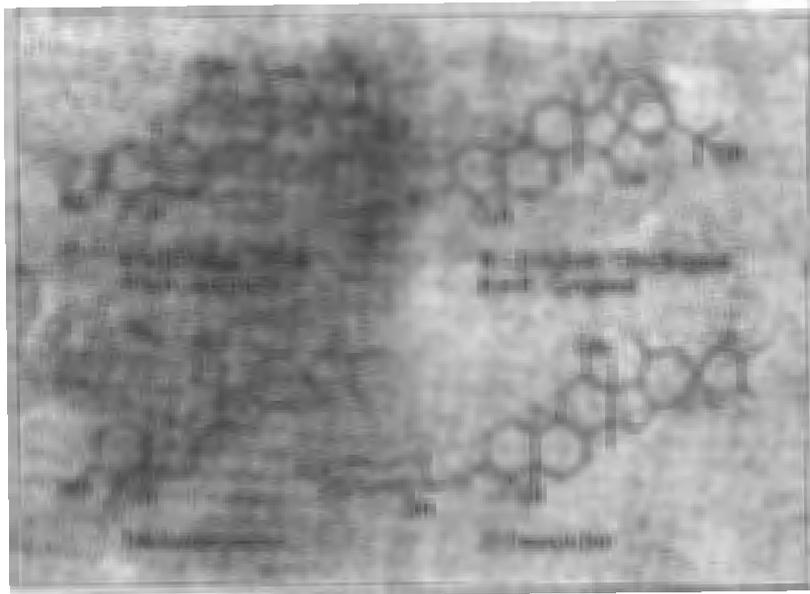
สารที่พิสูจน์แล้วว่าเป็นสารออกฤทธิ์คือ triterpene glycosides ได้แก่ xylosides actein, 27-deoxyactein (สูตรที่ 2) และ

อนุพันธ์ของสารประกอบฟีนิลโพรเพน (phenylpropane derivatives) เช่น isoferulic acid, salicylic acid, tannins, resins, fatty acids, starch, fat และ sucrose<sup>7,8</sup>

#### ประวัติการใช้ Black Cohosh

เป็นที่รู้จักกันดีและใช้เป็นยามาตั้งแต่ยุคกลาง มีการกล่าวถึงพืชนี้ตั้งแต่

ศตวรรษที่ 17 โดย R. Morrison ครั้งนั้นได้เรียกชื่อทางพฤกษศาสตร์ของพืชชนิดนี้ว่า *Christophoriana canadensis* และเรียกกันว่า พืชของคริสโตเฟอร์ แต่ปัจจุบันไม่ได้ใช้ชื่อนี้แล้ว ในช่วงต้นศตวรรษที่ 18 ได้มีการกล่าวถึงสมุนไพรตัวนี้ใน American Botanic Garden ของ John Bartram และมีเขียนอยู่ใน *Materia Medica* โดย Linne



รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ triterpenes ที่มีอยู่ใน *Cimicifuga racemosa*<sup>®</sup>

ในอดีตชาวอเมริกันอินเดียนและนักล่าอาณานิคม ใช้สารสกัดจาก Black Cohosh สำหรับรักษาโรคหลายชนิด จากประสบการณ์ใช้ในการรักษาโรคปวดตามข้อ ปวดกล้ามเนื้อและประสาท รักษาความไม่สบายตัวในวัยหมดระดู โรคทางสูติรีเวช ทั่วๆ ไป<sup>9,10</sup>

Black Cohosh เป็นตัวยาสำคัญในตำรับยาแผนโบราณที่ใช้รักษาอาการหมดประจำเดือน ดังเช่นที่รู้จักกันดีในชื่อว่า Lydia Pinkham's Compound จากผลการศึกษาทางคลินิกในเยอรมันที่แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจาก Black Cohosh ที่ทำเป็นยาและใช้ชื่อการค้าว่า Remifemin<sup>®</sup> ใช้แก้อาการ

ร้อนวูบวาบและอารมณ์หงุดหงิดได้ผลดีกว่า ยาหลอก และให้ผลเท่าเทียมกับเอสโตรเจน ชนิดคอนจูเกตในขนาด 0.625 มก. ทำให้มีความสนใจนำยานี้มาใช้กับสตรีวัยทองมากขึ้น<sup>4</sup>

#### สารสกัดมาตรฐานที่ทำเป็นยา

ในยาน้ำ 100 มล. ประกอบด้วยตัวยาสกัดที่ได้จากการสกัดราก *Cimicifuga racemosa* ในอัตราส่วน 1:5 (สารที่ใช้สกัดเป็น ethanol 50-60% โดยปริมาตร จำนวน 12 มล. เทียบเท่ากับยา 2.4 กรัม<sup>11</sup> เมื่อทำเป็นยาเม็ดแล้ว กำหนดให้ใน 1 เม็ดมีส่วนประกอบของตัวยาสกัดที่ได้จากสารสกัดของราก *Cimicifuga racemosa* จำนวน 0.018-0.026 มล. (0.78-1.14:1) โดยที่เทียบเท่ากับสมุนไพรจำนวน 20 มก. มาสกัดด้วย isopropyl alcohol 40 % โดยปริมาตร ในยาเม็ดยังมีส่วนผสมอื่นๆ อีกด้วย เช่น ผงเซลลูโลส แลคโตส โมโนฮัยเดรต แป้งจากมันฝรั่ง แมกนีเซียมสเตียเรต น้ำมันเปปเปอร์มินต์

#### ข้อบ่งใช้

อาการไม่สบายตัวในระยะใกล้หมดระดู เช่น ร้อนวูบวาบ เหงื่อออกมากกว่าปกติ นอนไม่หลับ กระวนกระวาย และมีอารมณ์ซึมเศร้า เนื่องจากการแปรปรวนของฮอร์โมน อาการไม่สบายก่อนมีประจำเดือน และสภาวะขาดประจำเดือน<sup>11</sup>

#### รูปแบบการออกฤทธิ์

ในอดีตเคยคิดว่า Black Cohosh มีฤทธิ์เป็นฮอร์โมนเอสโตรเจน ต่อมาได้ทำ

การตรวจสอบแล้วพบว่า สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ผสมน้ำจากพืชชนิดนี้ไม่มีฮอร์โมนจากพืช เช่น formononetin และ genistein<sup>12</sup> จากการทดลองในหนูถีบจักรและหนูขาวที่ตัดรังไข่ออกแล้ว พบว่าสารสกัดนี้ไม่มีฤทธิ์แบบเอสโตรเจนที่มีผลต่อมดลูกหนูถีบจักรและหนูขาว<sup>13</sup> จากการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์เต้านมมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย พบว่าสารสกัดจาก Black Cohosh ไม่มีผลแบบเอสโตรเจนที่ทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์เต้านมมนุษย์ที่เพาะเลี้ยง แต่กลับมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์<sup>14</sup> ผลการทดลองที่ทำในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจาก Black Cohosh มีฤทธิ์ไปแย่งจับกับตัวรับของเอสโตรเจนแบบแข่งขัน (competitive antagonist)<sup>9</sup>

ได้มีผู้สันนิษฐานไว้ว่าฤทธิ์ในการลดอาการไม่สบายตัวจากภาวะหมดประจำเดือน เช่น ร้อนวูบวาบ เหงื่อออกมากตอนกลางคืน และอื่นๆ ที่เกิดขึ้น อาจเนื่องจากยาไปมีผลยับยั้งการหลั่ง LH จากต่อมพิทูอิทารี เนื่องจากพบว่า Remifemin<sup>®</sup> ทำให้ระดับ LH ในพลาสมาลดลง แต่ไม่มีผลกับระดับ FSH ในหนูขาวและสตรีที่ผ่าตัดเอารังไข่ออก<sup>15,16</sup> แต่ผลที่พบจากการศึกษาทางคลินิกของ Lehmann-Willenbrock and Riedel ในปี พ.ศ. 1988 ระบุว่า ไม่พบว่ามี การกดระดับ LH ของผู้ป่วยที่รักษาด้วย *C. racemosa* นาน 3-6 เดือน<sup>17</sup> เช่นเดียวกับผลที่ได้จากการสังเกตในผู้ป่วยที่ไม่พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุช่องคลอดและระดับฮอร์โมน LH, FSH, estradiol, prolactin, SHBG ตลอดจนความหนาของเยื่อบุมดลูก<sup>11</sup>

ถึงแม้ว่ารูปแบบการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากราก *C. racemosa* ที่พบจากการรักษาในคลินิกไม่สามารถอธิบายได้แน่นอน แต่มีสันนิษฐานไว้ว่า สารสกัดนี้อาจมีฤทธิ์แบบเอสโตรเจนได้ในเนื้อเยื่อบางชนิด มีความพยายามอธิบายกลไกการออกฤทธิ์โดยเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในพืชที่ใกล้เคียงกัน เช่น ผลการศึกษาในสมุนไพรจีนชื่อ Shengma ซึ่งเป็นรากของ *Cimicifuga* อีกชนิดหนึ่ง พบว่ายาจีนชนิดนี้มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง โดยที่สารสกัดด้วยน้ำจากรากมีผลต่อตัวรับของซีโรโทนิน ( $5\text{-HT}_{1A}$ )<sup>18</sup> จากผลการทดลองในสัตว์ทดลองพบว่าสารสกัดนี้มีฤทธิ์ยับยั้งสารสื่อประสาทซีโรโทนิน<sup>19</sup> ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการรักษาทางคลินิกที่แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจาก *Cimicifuga racemosa* ช่วยลดอาการซึมเศร้าได้ โดยที่ผลดังกล่าวนี้น่าจะเป็นผลจากฤทธิ์ต่อจิตประสาทอย่างอ่อนๆ<sup>20,21</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจาก *Cimicifuga racemosa* สามารถเสริมฤทธิ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นยาต้านอาการซึมเศร้า เช่น St. John's wort (*Hypericum perforatum*) เมื่อให้ร่วมกันในการรักษาทางคลินิก<sup>10,22-24</sup>

มีความพยายามสันนิษฐานต่อไปถึงการรักษาอื่นๆ โดยขยายผลจากการศึกษาในพืช *Cimicifuga* ชนิดอื่นๆ อีก เช่น พบว่าสารประกอบที่อยู่ในรากของ *Cimicifuga* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ แก้ปวด และลดไข้<sup>25,26</sup> นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากราก *Cimicifuga* อื่นๆ เช่น *C. heracleifolia* และ *C. foetida* มีฤทธิ์ยับยั้งการสลายตัวของกระดูกในเนื้อเยื่อกระดูกที่เพาะเลี้ยง และมี

ฤทธิ์ป้องกันกระดูกพรุนในหนูขาวที่ทำให้ปราศจากรังไข่ด้วยฮอร์โมนพาราไทรอยด์<sup>10</sup>

#### รายงานผลการรักษา

ประมาณเกือบ 50 ปีมาแล้วที่ได้มีการรวบรวมรายงานการใช้ยาที่ได้จากสารสกัดที่ได้มาตรฐานของ *Cimicifuga* เพื่อรักษาความผิดปกติต่างๆ ทางสูตินรีเวช เช่น อาการไม่สบายตัวเนื่องจากการขาดฮอร์โมน อาการประจำเดือนมาไม่ปกติ เช่น ไม่มีประจำเดือน ประจำเดือนมีน้อยกว่าปกติ ขาดประจำเดือน และประจำเดือนมากเกินไป ความผิดปกติของวัยรุ่น อาการก่อนหมดประจำเดือน และความยุ่งยากระหว่างตั้งครรภ์<sup>27-32</sup> จากการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจาก *C. racemosa* ในผู้ป่วยรวมทั้งสิ้น 1,500 ราย พบว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ตอบสนองต่อการรักษาได้ดีถึงดีมาก และผู้ป่วยทนต่อสารสกัดได้ในระดับดีถึงดีมากเช่นกัน มีเพียงน้อยรายที่ระบุว่ามีอาการไม่ปกติของระบบทางเดินอาหารบ้างเป็นครั้งคราว<sup>10</sup> การศึกษาทางคลินิกส่วนใหญ่ที่ผ่านมาพอสรุปได้ดังนี้

ผลการศึกษาในคลินิกแบบ multi-center drug monitoring ที่ศึกษาในผู้ป่วย 704 ราย ประเมินผลจากผู้ป่วย 629 รายที่มีอาการไม่สบายตัวเนื่องจากภาวะหมดระดู โดยมีอายุเฉลี่ย 51 ปี และได้รับการรักษาด้วยสารสกัดแอลกอฮอล์จากราก *C. racemosa* ครั้งละ 40 หยด วันละ 2 ครั้งนาน 6-8 สัปดาห์ พบว่าอาการไม่สบายตัวต่างๆ ทางกาย ( ร้อนวูบวาบ เหงื่อออกมาก

ปวดศีรษะ วิงเวียน หัวใจเต้นเร็ว และหุ  
อ้อ) และอาการไม่สบายทางอารมณ์ (กังวล  
หงุดหงิดง่าย นอนไม่หลับ และอารมณ์ซึม  
เศร้า) 80% ของผู้ป่วยดังกล่าวมีอาการดีขึ้น  
หรืออาการดังกล่าวหายไปหลังจากได้รับยา  
นาน 4 สัปดาห์ ผู้ป่วย 93% ทนต่อยาได้ดี  
มีเพียง 7% ที่ทนต่อยาได้น้อยและมีอาการ  
ระคายเคืองของระบบทางเดินอาหารแบบชั่วคราวบ้าง<sup>28</sup>

จากการศึกษาในคลินิกของผู้ป่วยที่  
ได้รับการวินิจฉัยว่ามีอาการไม่สบายเนื่อง  
จากภาวะหมดระดู มีอายุในช่วง 42-60 ปี  
เลือกจับคู่ให้มีอายุ ส่วนสูง น้ำหนัก และ  
body mass index ที่ใกล้เคียงกัน และให้  
การรักษา 3-6 เดือน โดยให้สารสกัดที่  
ทำเป็นยาเตรียมรูปยาเม็ดหรือยาน้ำ เปรียบ  
เทียบผลการรักษาด้วย Kupperman Meno-  
pause Index<sup>29</sup> วิธีการประเมินนี้กำหนดให้  
อาการร้อนวูบวาบมีคะแนนสูงเท่ากับ 4 มาก  
กว่าอาการอื่นๆ ที่มีร่วมด้วย ที่มีคะแนนเท่า  
กับ 1 ถึง 2 ค่าที่ได้นี้คูณด้วยค่าคอนเวอชัน  
แฟคเตอร์ที่กำหนดตามความรุนแรงของ  
อาการ (อยู่ในช่วง 0-3 โดยที่รุนแรง = 3  
และไม่มีอาการ = 0) นำค่าที่ได้มาบวกกัน  
จะได้คะแนนรวมทั้งหมดซึ่งแสดงถึงความ  
รุนแรงของอาการ (อาการรุนแรงจะมีค่า  
คะแนนรวมมากกว่า 35 อาการปานกลางมี  
ค่ารวมเท่ากับ 20-35 และอาการอ่อนๆ จะ  
มีคะแนนรวม 15-20) การรักษาที่ได้ผล  
เป็นที่น่าพึงพอใจ ควรมีคะแนนต่ำกว่า 15  
จากการศึกษาแบบเปิด 2 ครั้ง แบบที่ไม่มี  
กลุ่มควบคุม ในผู้ป่วย 36 ราย อายุเฉลี่ย  
51.6 ± 5 ปี อยู่ในช่วง 45-62 ปี<sup>30</sup> และ  
การศึกษาผู้ป่วยจำนวน 50 ราย อายุเฉลี่ย

53.3 ± 4.3 ปี อยู่ในช่วง 45-60 ปี<sup>31</sup>  
ประเมินผลโดยใช้ Kupperman Menopause  
Index และ Clinical Global Impression  
Scale (CGI) ประเมินประโยชน์ใช้และ  
ความทนต่อยา พบว่าประสิทธิผลของการ  
รักษาเกิดขึ้นหลังจากเริ่มรักษานาน 4  
สัปดาห์ ด้วยสารสกัดแอลกอฮอล์ครั้งละ 40  
หยด วันละ 2 ครั้ง นาน 12 สัปดาห์ หลัง  
จากประเมินผล พบว่าผู้ป่วยมีอาการดีขึ้น  
มาก ความสำเร็จของการรักษามีนัยสำคัญที่  
p<0.001 ผลที่ได้จากการให้ผู้ป่วยประเมิน  
อาการทางอารมณ์ด้วยตนเองตามวิธี Profile  
of Mood Scale (POMS) พบว่าผู้ป่วย  
ประเมินให้ยามีผลการรักษาในระดับดีมาก<sup>31</sup>  
ผู้ป่วยทุกรายทนต่อยาได้ดี มีเพียง 4 รายที่  
รายงานว่ามีปัญหาเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร  
เล็กน้อยเมื่อตอนเริ่มต้นการรักษา

จากการศึกษาแบบเปิดชนิดที่มีกลุ่ม  
ควบคุม ในคนไข้ทั้งหมด 60 ราย แบ่งออก  
เป็น 3 กลุ่มโดยวิธีสุ่ม<sup>32</sup> กลุ่มละ 20 คน มี  
อายุโดยเฉลี่ย 54 ± 4 ปี ช่วงอายุ 45-60 ปี  
รักษาด้วยสารสกัดแอลกอฮอล์ จำนวน 40  
หยด วันละ 2 ครั้ง กลุ่มที่สองได้รับการ  
รักษาด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดคอนจู-  
เกต 0.625 มก./วัน และกลุ่มที่สามได้รับยา  
ไดอะซีแพมขนาด 2 มก./วัน ให้การรักษา  
นาน 3 เดือนแล้วประเมินผล พบว่าสาร  
สกัดจาก Black Cohosh ทำให้อาการไม่  
สบายกายและใจลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (p  
<0.05) เมื่อประเมินผลด้วย Kupperman  
Menopause Index, Self Evaluation  
Depression Scale และ Hamilton Anxiety  
Scale (HAMA) สารสกัด Black Cohosh  
ให้ผลที่ประเมินได้เท่ากับเอสโตรเจนและยา

ไดอะซีแพมเมื่อประเมินโดยวิธี CGI พบว่าผู้ป่วยให้ความร่วมมือต่อการกินยาเป็นอย่างดี ทั้งยังทนต่อยาได้ดีด้วย

ประสิทธิภาพในการรักษาของสารสกัด Black Cohosh ด้วยแอลกอฮอล์ไอโซ-โพรพานอล ครั้งละ 2 เม็ด วันละ 2 ครั้ง เพื่อรักษาอาการไม่สบายตัวเนื่องจากหมดประจำเดือน ได้รับการยืนยันด้วยการศึกษาแบบบอด 2 ด้าน (double blind) โดยการสุ่มตัวอย่าง และมียาหลอกเป็นกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดคอนจูเกต 0.625 มก./วัน จำนวน 80 ราย อายุเฉลี่ย  $51.2 \pm 3.1$  ปี ช่วงอายุ 45-58<sup>33</sup> ผู้ป่วย 30 รายที่ได้รับสารสกัด Black Cohosh มีคะแนนที่ประเมินด้วยวิธี Kupperman Menopause Index และ HAMA เทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอกจำนวน 20 ราย แสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยที่ได้รับยามีอาการดีขึ้นหลังจากได้รับยานาน 4 สัปดาห์ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) ก่อนที่จะถึงสัปดาห์ที่ 12 ซึ่งเป็น การสิ้นสุดการรักษา ผลจากการประเมินด้วย Kupperman Menopause Index เท่ากับ 15 หรือน้อยกว่า แสดงว่าไม่จำเป็นต้องให้การรักษาต่อไปอีก หลังจากรักษาด้วยสารสกัด *C. racemosa* นานถึง 3 เดือน ผลการรักษาดีกว่าเอสโตรเจนชนิดคอนจูเกต อาการไม่พึงประสงค์เช่นปวดศีรษะที่พบไม่เกี่ยวข้องกับการได้รับยาทั้ง 3 กลุ่มรวมทั้งกลุ่มที่ได้รับยาหลอกด้วย

จากการศึกษาทางคลินิกแบบเปิด โดยไม่มีกลุ่มควบคุม ในผู้ป่วยที่เปลี่ยนจากการใช้ฮอร์โมนทดแทนตามปกติมาเป็น Remifemin® ครั้งละ 2 เม็ด วันละ 2 ครั้ง

นานถึง 6 เดือน พบว่าผู้ป่วย 56% ( $n=50$  อายุเฉลี่ย 49 ปี) ที่เคยได้รับฮอร์โมนแทนเป็นยาฉีด estradiol valerate 4 มก. และ progesterone enanthate 200 มก. ไม่จำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วยฮอร์โมนอีก เมื่อได้รับสารสกัดจาก *C. racemosa* ผู้ป่วยอีก 44% ยังคงต้องการให้ฉีดฮอร์โมนอีก เมื่อทำการประเมินด้วย Kupperman Menopause Index Score ค่าคะแนนที่ได้ต่ำกว่า 15 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.001$ ) แสดงว่าการรักษาประสบความสำเร็จ<sup>34</sup>

พบว่าให้สารสกัดจาก Black Cohosh ในสตรีที่ขาดฮอร์โมนเนื่องจากผ่าตัดรังไข่ก็ได้ผลดี จากการศึกษาเปรียบเทียบกับ การให้ฮอร์โมนทดแทนในสตรีอายุต่ำกว่า 40 ปีที่ผ่าตัดรังไข่ไปแล้วมีอาการไม่สบายดังกล่าว จำนวน 60 คน<sup>42</sup> แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 15 คน กลุ่มแรกได้รับฮอร์โมน estriol (1 มก./วัน) กลุ่มที่สองได้รับเอสโตรเจนชนิดคอนจูเกต (1.25 มก./วัน) กลุ่มที่สามได้รับฮอร์โมนผสมที่มี estradiol 2 มก. ร่วมกับ norethisterone acetate 1 มก. กับกลุ่มที่รักษาด้วยสารสกัด *C. racemosa* ที่สกัดด้วย isopropanol (ครั้งละ 2 เม็ด วันละ 2 ครั้ง) พบว่าหลังจากรักษาไป 6 เดือนแล้ว ผู้ป่วยมีอาการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่รักษาทั้ง 4 กลุ่มที่ สัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12 ไม่พบว่ามียากลุ่มใดที่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน LH และ FSH ในซีรัม

การศึกษาความเป็นพิษของยา

จากรายงานของบริษัท Schaper &

Bruemmer ซึ่งเป็นผู้ผลิต Remifemin® พบว่าจากการศึกษาความเป็นพิษชนิดเรื้อรัง (นาน 6 เดือน) ของสารสกัดของยา Remifemin® ที่ทำในรูป granule กับหนูขาวพันธุ์วิสตาร์เพศเมีย ไม่พบว่าสารสกัดดังกล่าวที่มีขนาดสูงถึง 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวนานถึง 8 สัปดาห์ ทำให้เกิดความเป็นพิษแก่หนูขาว แสดงว่าสารสกัดนี้มีความปลอดภัยสูง จากการทดสอบการละลายพันธุ์ด้วยวิธี Ames test ในขนาด 0.32-1,000 มก. ต่อจานเลี้ยงเชื้อ แสดงให้เห็นว่าไม่มีผลทำให้เชื้อซัลโมเนลลาเกิดการละลายพันธุ์ได้ ไม่พบว่าทำให้เกิดการละลายพันธุ์ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับ negative control เมื่อมี S9 (เพื่อกระตุ้นเมตาโบลิซึมของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) ผสมอยู่ด้วย<sup>11</sup>

#### ข้อควรระวังและปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์

ยังไม่มีรายงานถึงข้อห้ามใช้หรือการเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์กับยาอื่น พบว่ามีผลเสริมฤทธิ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอาการซึมเศร้าได้ เช่น St. John's wort

#### ฤทธิ์ข้างเคียง

จากการศึกษาทางคลินิกพบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่สามารถทนต่อยาได้ดี แต่ก็มีบางรายมีอาการระคายเคืองบ้างเล็กน้อยที่ทางเดินอาหาร

#### ขนาดใช้

สำหรับสารสกัดที่ทำเป็นยาที่มีชื่อการค้าว่า Remifemin® กำหนดให้ครั้งละ 1 เม็ด วันละ 2 ครั้ง เข้าและเย็น สำหรับยาน้ำให้ครั้งละ 20 หยด วันละ 2 ครั้ง

ผลของยาจะไม่เกิดขึ้นทันที ผลการรักษาครั้งแรกจะเห็นได้หลังจากการรักษา 2-4 สัปดาห์ ถึงแม้ว่าตัวยาจะมีความปลอดภัยสูงและผู้ป่วยทนต่อยาได้ดี ก็ไม่แนะนำให้ใช้ยานานเกิน 6 เดือนโดยปราศจากการดูแลของแพทย์

#### ขนาดบรรจุ

ยาน้ำขนาด 50, 100, 150 มล. และขนาดบรรจุของโรงพยาบาล 500 มล. ส่วนยาเม็ดมี 60, 100 และ 200 เม็ด ส่วนขนาดของโรงพยาบาล 1,000 เม็ด<sup>11</sup>

#### สรุป

ยาที่ได้จากสารสกัดหยาดของราก *Cimicifuga racemosa* ที่มีมาตรฐานของปริมาณสารออกฤทธิ์ในรูปแบบของยา เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการรักษาอาการไม่สบายกายและจิตใจของสตรีวัยทอง โดยอาจให้ร่วมกับการรักษาด้วยฮอร์โมนทดแทนหรือใช้แทนฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยทองที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมและมะเร็งมดลูก หรือในสตรีวัยทองที่ปฏิเสธการรักษาด้วยฮอร์โมนทดแทนเนื่องจากฤทธิ์ข้างเคียง พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่ยอมรับและทนต่อยาได้ดี อย่างไรก็ตามควรอยู่ในความดูแลของแพทย์เมื่อจำเป็นต้องใช้ยานี้เป็นเวลานานเกิน 6 เดือน โดยเหตุที่ยังไม่มีผลการศึกษาที่แน่นอนเกี่ยวกับการป้องกันการสลายตัวของกระดูกและผลที่ดีในการปกป้องหลอดเลือดและหัวใจ จึงแนะนำให้ใช้ Remifemin® ในกรณีบรรเทาอาการไม่สบายกายและใจในระยะวัยเปลี่ยน เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของสตรีในวัยทองและผู้ใกล้ชิด

## เอกสารอ้างอิง

1. Alpha Research, Manager Information Services, *Pocket Thailand Public Health*. 1994; Bangkok; Sukhum and Sons: 29.
2. สมณา ชมพูทวีป และนิกร ดุสิตสิน. การใช้ยารักษาสตรีวัยหมดประจำเดือน. *Thai J Pharmacol* 1996;18: 67-79.
3. The Canadian Consensus Conference on Menopause and Osteoporosis. Chapter 10 Pharmacotherapy. *J SOGC* 1998; Nov. : 47-54.
4. The Canadian Consensus Conference on Menopause and Osteoporosis. Chapter 11 Menopause: Complementary Approaches. *J SOGC* 1998; Nov. :55-62.
5. Ravnikaar VA. Compliance with hormone therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156:1332-4.
6. Mantyranta T, Hemminki E, Kangas I. Alternative drug use for the climacteric in Finland. *Maturitas* 1997;27:5-11.
7. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. *Cimicifuga racemosa*. In: Fleming T, editor. PDR for Herbal Medicines 1<sup>st</sup> ed. Montvale, New Jersey: Medical Economics Company, 1998 : 746-747.
8. Beuscher N. *Cimicifuga racemosa*. Die Traubensilberkerze. *Z Phytother.* 1995;16:301-310.
9. Jarry H, Gorkow C, Wuttke W. Treatment of menopausal symptoms with extracts of *Cimicifuga racemosa*: II: in vitro binding of compounds to estrogen receptors. *Plant Med* 1985; 4:316-319.
10. Liske E. . Therapeutic efficacy and safety of *Cimicifuga racemosa* for gynecological disorders. *Adv Natural Therapy* 1998; 15(1):45-51.
11. Remifemin<sup>®</sup> active substance: liquid *Cimicifuga* extract the Herbal preparation for gynecology. *Scientific Brochure* 1998: 1-11.
12. Struck D, Tegtmeier M, Harnischfeger G. Flavones in extracts of *Cimicifuga racemosa*. *Planta Medica* 1997; 63: 289-290.
13. Einer-Jensen N, Zhao J, Andersen KP, Kristoffersen K. *Cimicifuga* and *Melbrosia* lack oestrogenic effects in mice and rats. *Maturitas* 1996; 25:149-153.
14. Nesselhut T, Schekkhase C, Dietrich R, Kuhn W. Studies on mammal carcinoma cells regarding the proliferative potential of herbal medications with estrogen-like effects. *Archives Gyn Obstetrics* 1993; 254: 817-818.
15. Jarr H, Harnischfeger G. Untersuchungen zur endokrinen Wirksamkeit von Inhaltsstoffen aus *Cimicifuga racemosa*. I. Einfluss auf die Serumspiegel von Hypophysenhormonen ovariectomierter Ratten. *Planta Medica* 1985; 1:46-49.
16. Dueker E-M, Kopanski L, Jarry H, Wuttke W. Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Medica* 1991; 57:420-424.
17. Lehmann-Willenbrock W, Riedel HH. Clinical and endocrinologic examinations concerning therapy of climacteric symptoms following hysterectomy with remaining ovaries. *Zent bl Gynaekol* 1988; 110: 611-618.
18. Liao JF, Jan YM, Huang SY, Wang HH, Yu LL, Chen CF. Evaluation with receptor binding assay on the water extracts of ten CNS-active Chinese herbal drugs. Proceedings of the National Science Council, Republic of China. *Life Sci (B)*. 1995; 19: 151-158.
19. Yoo JS, Jung JS, Lee TH, et al. Inhibitory effects of extracts from traditional herbal drugs on 5-hydroxytryptophan-induced diarrhea in mice. *Korean J Pharmacog* 1995; 26:355-359.
20. Stoll W. Phytotherapeutikum beeinflusst atropisches Vaginalepithel : Doppelblindversuch *Cimicifuga* vs Östrogenpräparat. *Therapeuticum* 1987; 1:23-31.
21. ESCOP monographs on the medicinal uses of plant drugs. *European Scientific Cooperative on Phytomedicine* 1996; 1-30.
22. Linde K, Ramirez G, Mulrow CD, Pauls A, Weidenhammer W. St John's Wort for depression – an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *BMJ* 1996; 313: 253-258.
23. Heizer H. Kritisches zur *Cimicifuga*-Therapie bei hormonalen Störungen der Frau. *Med Klin* 1960; 55:232-233.
24. Goerlich N. Behandlung ovarieller Störungen in der Allgemeinpraxis. *Aerzt Praxis* 1962; 14:1742-1743.
25. Sakurai N, Nagai M. Chemical constituents of original plants of *Cimicifuga rhizomea* in Chinese medicine. *Yakugaku Zasshi* 1996; 116:850-865.
26. Hirabayashi T, Ochiai H, Sakai S, Nakajima K, Terasawa K. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on

- murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections in vitro and in vivo. *Plant Med* 1995; 61:221-226.
27. Bruecker A. Beitrag zur Phytotherapie hormonaler Stoerungen der Frau. *Med Welt* 1960; 44:2331-2333.
  28. Stolze H. Der andere Weg, klimakterische Beschwerden zu behandeln. *Gyne* 1982; 3:14-16.
  29. Kupperman HS, Wetchler BB, Blatt MHG. Contemporary therapy of menopausal syndrome. *JAMA* 1959; 171:1627-1637.
  30. Daiber W. Klimakterische Beschwerden: ohne Hormone zum Erfolg. *Aertz Praaxis* 1983; 35:1946-
  31. Vorberg G. Therapie klimakterische Beschwerden. Erfolgreiche hormonfreie Therapy mit Remifemine. *Z Allgemeinmed* 1984; 60:626-629.
  32. Warnecke G. Beeinflussung klimakterisch Beschwerden durch ein Phytotherapeutikum. *Med Welt* 1985; 36:871-874.
  33. Foeldes J. Die Wirkung eines Extraktes aus *Cimicifuga racemosa*. *Aerzt Forsch* 1959; 13:623-624.
  34. Pethoe A. Klimakterische Beschwerden. Umstellung einer Hormonebehandlung auf ein pflanzliches Gynaekologikum moeglich? *Aerzt Praxis* 1987; 38:1551-1553.
  35. Lehmann-Willenbrock E, Riedel HH. Klinische und endokrinologische Untersuchungen zur Therapie ovarieller Ausfallserscheinungen nach Hysterektomie unterbelassung der Adnexe. *Zentralbl Gynaekol* 1988; 110:611-618.

# ประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 23



สมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย

วันที่ 21-23 มีนาคม 2544

ณ ห้องประชุม คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

## PHARMACOLOGICAL DIGEST

Laddawal Phivthong-ngam

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand*

### **Acetaminophen : an Effective Treatment for the Least Disabling Migraines**

Acetaminophen is highly effective in treating pain, functional disability, photophobia, and phonophobia in some patients with migraine. The investigators randomized 289 subjects to treatment with oral acetaminophen 1000 mg or placebo for a single acute migraine attack. Excluded from the study were subjects who usually required bed rest with their migraine, or who vomited with more than 20% of their migraine attacks. At 2 hours postdose, 57.8% of patients in the acetaminophen arm and 38.7% in the placebo arm reported response to treatment. This included 22.4% and 11.3%, respectively, who were free of pain. For those reporting severe pain at baseline, response at 2 hours was 50.9% and 27%, respectively. Treatment was rated as good to excellent by 51.7% of subjects who used acetaminophen, compared with 28.2% of those treated with placebo. Similar trends were documented for the proportions of subjects whose functional disability, photophobia, and phonophobia were reduced to zero at 2 hours and 6 hours following treatment. However, the investigators observed no significant difference between groups in the proportion of patients whose nausea was relieved, and suggested that migraine was a symptom complex and that effective treatments that made the pain better also made the associated symptoms better.

[*Arch Intern Med* 2000; 160: 3486-3492]

### **Synthetic Helical Peptides Block HIV Infectivity**

Synthetic helical peptides derived from the fusion mediating portion of HIV glycoprotein gp41 potently inhibit HIV infection. The extracellular domain of gp41, including two helical regions, is important for oligomerization and virus-induced fusion, the authors explain. Both helical structure and bonding patterns called helix-capping motifs appear to be important in the inhibition of

fusion and infectivity seen with so-called C peptides derived from these regions. The investigators tested several synthetic peptides, designed to be highly helical in solution, with and without helix-capping motifs, for their HIV-inhibiting potential. Simply adding capping motifs to a 19 amino acids wild-type (WT) peptide (creating Caps-WT) did not induce the desired helical conformation, the report indicates, but changing eight residues to alanine or lysine (creating MT) did. Moreover, introducing capping motifs to the modified peptide (forming Caps-MT) significantly enhanced its helical conformation. Among the various peptides, WT and MT showed weak affinity to the coiled-coil motif needed for gp41 mediation of fusion, but peptides with capping motifs showed significant association. Caps-MT, with the highest helical propensity, also showed the highest affinity for the coiled-coil motif of gp41. In fact, binding affinity for the coiled-coil motif of gp41 proved to be proportional to the helical content of the peptides, the results indicate. The inhibition of cell fusion by the peptides paralleled their binding affinity for the coiled-coil motif of gp41, the investigators observe. Again, Caps-MT was the most effective inhibitor among the peptides tested. These observations indicated that the designed peptides were able to prevent the membrane fusion process mediated by gp41 by binding specifically to the coiled-coil motif of gp41. These results implied that such modification was enough to change a short peptide derived from gp41 into a potent inhibitor against the infection of HIV.

[*AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1797-1804]

### **Experimental Drug Reverses Cognitive Impairment in Rats**

The investigational drug GT 715 may restore lost brain function, results of an animal study suggest. The drug increases brain activity of guanylyl cyclase (sGC). GT 715 acts on the

same cell-signaling pathway as nitroglycerin, but the drug's action is targeted more to the brain than to the cardiovascular system. When GT 715 was administered to healthy rats before they entered a water maze, it did not affect their navigational abilities, even when given at very high doses. But when GT 715 was given to the animals after they had received another drug that reduced their mental abilities, the rats' performance improved, and higher doses of the drug led to greater improvement. This study provides the first evidence that activating sGC may improve mental performance. The results of this study therefore suggest that stimulation of cerebral sGC activity may be an effective strategy to improve learning and memory performance in individuals in whom cognitive abilities are impaired by injury, disease or aging. The researchers' goal is to develop a drug that not only relieves symptoms of neurological diseases but also prevents further impairment. Depending on funding for the research, a safety study of GT 715 may begin within the next year or so.

[*NeuroReport* 2000; 11: 3883-3886]

#### **Sexual Behavior Abolished in Male Mice Lacking Estrogen Receptors**

Male mice engineered to lack both the alpha and beta estrogen receptors show no sexual behavior toward receptive female mice and greatly reduce their aggressive behavior toward other male mice. The investigators found that these mice exhibited no sexual behavior, including simple mounting. In addition, ultrasonic vocalization, a normal male mating behavior, did not occur in the presence of a receptive female mouse. Aggressive behaviors such as lunge and bite aggression were also reduced and they rarely demonstrated offensive attacks. It appears that either one of the estrogen receptors is sufficient for the expression of simple mounting in male mice, indicating a redundancy in function. Offensive attacks, on the other hand, depend specifically on the estrogen receptor-alpha gene. In other studies, it has been shown that all components of sexual behavior are intact when estrogen receptor-beta is missing, and that decreased intermissions and no ejaculations occur when estrogen receptor-alpha is lacking.

[*Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14737-14741]

#### **Lotronex Withdrawn from US Market**

At the request of the US Food and Drug Administration (FDA), Glaxo Wellcome announced that it would voluntarily withdraw alosetron (Lotronex), a prescription medication for the treatment of women with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome (IBS) and planned to cease distribution of Lotronex immediately. Glaxo Wellcome took this step after in-depth discussions with the FDA about gastrointestinal adverse effects such as ischemic colitis that occurred in association with the use of Lotronex. There also have been 5 fatalities from complications of gastrointestinal events, although Glaxo Wellcome has stated that it does not believe that a causal relationship to Lotronex has been established. Glaxo Wellcome has proposed a range of elements which the company believed would adequately and effectively address these risks. These included further label modifications, restricted distribution, on-going patient education, new clinical and epidemiological research, and use of an independent medical review board. The FDA, however, called these proposals inadequate and requested that Glaxo Wellcome voluntarily withdraw Lotronex from the market. Glaxo Wellcome took a different view from FDA on the ability to educate physicians and patients about the management of potential adverse effects and benefits of Lotronex. However, Glaxo Wellcome representatives will immediately contact healthcare professionals to advise them of the discontinuation of distribution and marketing. Physicians should then begin contacting their patients to discuss a plan to transit them to alternative therapies. IBS is a chronic, recurring condition that affects an estimated 1 in 5 Americans. Although the cause is unknown, IBS is characterized by multiple symptoms that include chronic or recurrent abdominal pain and discomfort and irregular bowel function.

[<http://www.medscape.com/MedscapeWire/2000/1100/medwire.1129.Lotronex.html>]

#### **Receptor Desensitization Linked to Morphine Tolerance**

While still capable of developing physical dependence, mice lacking beta-arrestin-2 (beta-arr-2) fail to develop morphine tolerance. The main clinical implication of these findings is that inhibiting the process of G protein coupled

receptor desensitization can augment the efficacy of agonist drugs or endogenous agonists. With respect to morphine, inhibitors of the desensitization process will not only greatly potentiate the analgesic effects of morphine and reduce tolerance, but also, because of the lower doses of drug needed, will reduce unwanted side effects. The investigators found that unlike wild-type mice, which experienced a 50% drop in morphine responsiveness after a high priming dose of morphine, beta-arr-2 knockout mice maintained the same degree of responsiveness to morphine. Similar results were seen after daily administration of morphine. Chronic daily administration of morphine shifted the dose-response curve of wild-type mice in the direction of diminished sensitivity, the researchers noted, but had no effect on the dose-response of beta-arr-2 knockout mice. In contrast, both wild-type and knockout mice with prolonged exposure to morphine experienced withdrawal after administration of naloxone and showed increases in adenylyl cyclase activity, a hallmark of opiate physical dependence.

[*Nature* 2000; 408: 720-723]

#### **Peptide Mixture Improves Cognition in Alzheimer's Disease Patients**

Cerebrolysin, produced by enzymatic breakdown of lipid-free porcine brain protein to free amino acids and peptides, which has been shown in previous studies to improve various facets of brain function in Alzheimer's disease patients, appears to be safe and effective when used over a 4-week period to treat cognitive deficits and global function in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. The study by Dr. Chul-Young Bae, of Pochon CHA Medical University, in Kyonggi-do, and associates, examined the effect of cerebrolysin on different primary and secondary outcome measures. Thirty-four subjects were administered intravenous 30 mL cerebrolysin in 100 mL saline 5 days a week for 4 weeks, while 19 subjects received placebo. According to the Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive subscale, patients in the treatment arm had a significant mean improvement of 3.23 points compared with a change of only 0.36 point in the placebo arm. On this subscale, 82.4% of cerebrolysin-treated patients improved versus 31.6% of placebo-treated patients. The authors noted that the 2.87-point benefit of cerebrolysin over placebo

was comparable to results exhibited by the cholinesterase inhibitors tacrine, donepezil, and metrifonate. Similar findings were documented for the Clinical Global Impression of Severity/Change and the Mini-Mental State Examination.

[*J Am Geriatr Soc* 2000; 48: 1566-1571]

#### **Tumor Suppressor Gene Expression Inhibits Angiogenesis in Murine Model**

Expression of RB2/p130, a member of the retinoblastoma tumor suppressor gene family, inhibits angiogenesis and down regulates vascular endothelial growth factor expression in vivo. Using cell culture methods and a murine model, the investigators assessed the vascular-related effects of experimentally induced RB2/p130 gene expression in lung cancer and glioblastoma cell lines, and found that induction of RB2/p130 gene expression, achieved through a variety of techniques, inhibited angiogenesis in the murine model. This finding correlated with the results of in vitro and in vivo analyses that showed a down regulation of vascular endothelial growth factor protein expression when the gene was expressed. This study showed that the tumor used vascular endothelial growth factor to have the host cell produce vessels to feed it and the number of vessels that would form normally in the control tumor could be inhibited 10 times. RB2 has been shown to be one of the few molecules that can strongly inhibit the growth of tumor cells in animal tests, suggesting that it can be a new biological drug. The research's goal is still to seek FDA [US Food and Drug Administration] approval and to bring this entire system to patient trials. Eventually, especially for lung cancer, the researchers want to develop an easier way of delivering RB2, perhaps by aerosol and are in the process of designing small molecules to more efficiently deliver the small portion of RB2 necessary to inhibit tumor growth.

[*Cancer Res* 2001; 61: 462-468]

#### **Mechanism of Action of IVIG Identified**

Clearing the way for the development of new drugs to treat autoimmune disorders, researchers have determined the mechanism of action of intravenous gamma globulin (IVIG), long used to treat infectious and inflammatory diseases. In a mouse model of immune thrombocytopenia, they found that IVIG induced the expression of an inhibitory Fc

receptor, Fc-gamma-RIIB, on splenic macrophages and prevented platelet consumption. They treated mice with an antiplatelet monoclonal antibody, which mimicked a pathogenic autoantibody and induced immune thrombocytopenia. Disease was dependent on the presence of the Fc-gamma-RIII receptor, and either IVIG or its Fc fragments were effective in protecting against disease. Next, the researchers induced disease in mice whose endogenous Fc-gamma-RIII gene was replaced by the human Fc-gamma-IIIA gene, which was not expressed on neutrophils. The mice were still susceptible to disease, so the authors suggested that neutrophils were not necessary to induce disease. In addition, since splenectomy protected against disease, they suggested that splenic cells such as macrophages were necessary to induce disease. According to the results of previous studies, the effects of Fc-gamma-III were balanced by an inhibitory receptor, Fc-gamma-RIIB, so the researchers induced disease in mice lacking the inhibitory receptor. The mice were susceptible to disease and could not be protected by treatment with IVIG. Further investigation showed that in normal mice, IVIG treatment led to a 60% increase in the number of splenic macrophages expressing high levels of Fc-gamma-RIIB. These data support the conclusion that IVIG mediates its protective effect by its ability to induce the expression of inhibitory Fc-gamma-RIIB receptor on effector cells that will otherwise trigger clearance of the opsonized platelets. Although the experimental model is quite different from the clinical situation, in that IVIG is administered before the pathogenic autoantibody. Nevertheless, the study demonstrates that Fc-gamma-RIIB is crucial for mediating the anti-inflammatory activity of IVIG and that modulating surface expression of Fc-gamma-RIIB is a viable strategy for treating autoimmune disorders. The way is now clear to develop potent drugs that can mimic the effects of IVIG on Fc-gamma-RIIB expression.

[*Science* 2001; 291: 484-486]

### **New Survey Illustrates Trends in Parkinson's Disease Treatment**

According to survey results released on Monday by the American Parkinson's Disease Association, Inc. (APDA), nearly 92% of neurologists surveyed have shifted their prescribing behaviors during the past 3 years,

with 85% now prescribing dopamine agonists as a first-line treatment of choice. The survey polled 205 practicing neurologists to determine their views and current prescribing behaviors of Parkinson's disease. There is an ongoing controversy in the medical community whether patients should be given levodopa or a dopamine agonist as an initial treatment for Parkinson's disease. Levodopa has been the "gold standard" for 35 years and is used in a majority of patients. Unfortunately, over time, levodopa can cause dyskinesias that can inhibit patients' ability to function. Dopamine agonists are a class of drugs that mimic the effects of dopamine in the brain by stimulating dopamine receptors; research shows that dopamine agonists may lower a patient's risk of developing the uncontrollable and irreversible dyskinesias often associated with levodopa therapy. Knowledge of Parkinson's disease has grown tremendously over the past few years. Recent controlled studies suggest that, in many patients, dopamine agonists are an excellent alternative to levodopa in the early stages of Parkinson's disease. These results indicate that the treating physicians are incorporating the results from recent trials into their clinical practice. The survey was conducted by Hospital Research Associates at the 52nd American Academy of Neurology (AAN) Annual Meeting in San Diego, California. Other survey results indicated:

- 93% of neurologists cite dyskinesias as a problem for Parkinson's disease patients on levodopa therapy.
- 76% believe initial therapy with a dopamine agonist helps delay the need to initiate levodopa therapy.
- 77% believe initial therapy with a second generation dopamine agonist helps delay the development of dyskinesias.
- 88% note Parkinson's disease patients are taking a more active role in the treatment of their disease.
- 79% choose to start treating younger Parkinson's disease patients with dopamine agonists.

[<http://www.medscape.com/MedscapeWire/2001/0100/medwire.0109.Survey.html>]

### **Perforin and Interferon-Gamma Contribute Independent Antitumor Effects**

Perforin and interferon-gamma independently and equally account for the natural antitumor activity mediated by natural killer (NK) cells in mice. While perforin (pfp) expression has been

previously shown to prevent tumor initiation, growth and metastasis, it cannot account for all the tumor protection afforded by NK and NKT cells, the authors explain. The possible role of interferon (IFN)-gamma in the natural antitumor response has not been compared previously with that of pfp. The investigators examined the relative role of pfp and IFN-gamma in three distinct models of tumor immunity in mice. Mice deficient in either pfp or IFN-gamma developed significantly more metastases than did wild-type mice, but they developed fewer metastases than did mice depleted of NK cells. Mice doubly deficient in pfp and IFN-gamma proved as susceptible as NK-cell-depleted mice to tumor metastasis. The results in mice deficient for pfp, or pfp and IFN-gamma, indicated that this independent antimetastatic function of NK cells might involve both the cytolytic activity of pfp and antitumor activity of IFN-gamma. Both pfp and IFN-gamma deficient mice developed significantly more MCA-induced fibrosarcomas than did normal mice, the report indicated, and doubly deficient mice developed as many sarcomas as did NKT-cell-depleted mice. The authors demonstrated for the first time that in innate antitumor responses that involve relatively different contributions by NK and NKT cells, the killer cell pfp and cytokine IFN-gamma constituted independent mechanisms that together controlled tumor initiation and metastasis. The investigators indicated that future research efforts would be directed at defining how these antitumor effects were orchestrated.

*[Blood 2001; 97: 192-197]*

#### **ZymoGenetics Researchers Identify New Molecule Related to Psoriasis**

Researchers at Seattle, Washington-based ZymoGenetics, Inc. have identified a new member of the interleukin family of proteins that may be implicated in the development of psoriasis. The researchers discovered the human gene coding for the molecule, designated as interleukin 20 (IL-20), belonging to a class of cytokines responsible for regulating cellular processes in healthy and diseased tissues. The scientists further characterized the interaction between the IL-20 protein and a cell-surface receptor composed of two sub-units, named IL-20R alpha and IL-20R beta, which were present in human skin cells. In transgenic mice genetically engineered to overproduce IL-20 within their bodies,

ZymoGenetics scientists observed that the mice developed skin similar to psoriatic skin lesions in human. In a culture study, the researchers also discovered that IL-20 appeared to stimulate the activation of human keratinocytes, cells presented in the outermost layer of the skin. Further analysis of human skin tissues for the presence of the two receptor subunits for IL-20 demonstrated that both molecules were present at very low levels in normal skin and also presented at much higher levels in psoriatic skin. The transgenic mice study indicated an "interesting association" between IL-20 and psoriasis. The IL-20 molecule is still in the "research" stage of development. The company plans further animal studies to determine if inhibition of the IL-20 ligand can play a therapeutic role in regulating the pathogenesis of psoriasis. Psoriasis affects between 1% and 2% of the United States population, or about 5.5 million people. Although the disease occurs in all age groups and about equally in men and women, it primarily affects adults. People with psoriasis may suffer discomfort, including pain and itching, restricted motion in their joints, and emotional distress.

*[<http://www.medscape.com/reuters/prof/2001/01/01.15/20010112scie006.html>]*

#### **New Hormone May Link Obesity to Diabetes**

Using a murine model, Pennsylvania investigators have identified a fat cell-secreted hormone, which they named resistin (for resistance), that causes insulin resistance similar to what seen in type II diabetic patients. The researchers from the University of Pennsylvania School of Medicine in Philadelphia, screened for genes that were present during fat cell differentiation but down regulated in mature fat cells exposed to the antidiabetic thiazolidinedione class of drugs. From this search, they discovered resistin. In the animal model, the authors found that circulating levels of resistin were decreased when the anti-diabetic drug rosiglitazone was given. Normal mice treated with a recombinant form of resistin had impaired glucose tolerance and insulin action. Mice with genetic and diet-induced forms of obesity demonstrated elevated levels of resistin. In addition, in mice with diet-induced obesity, antibodies against resistin improved blood sugar levels and insulin action. In vitro adipocyte analysis revealed that resistin treatment impaired

glucose uptake, and neutralization of the hormone enhanced uptake. Resistin is a strong candidate to explain the anti-diabetic effects of thiazolidinediones, as well as a mechanism by which excess adiposity leads to insulin resistance. If the regulation and properties of human resistin are similar to those of mouse resistin, potential anti-diabetic therapies could include reduction of serum resistin level, neutralization of the biological activity of circulating resistin, and/or antagonism of resistin action directed against the cellular receptor(s).

[*Nature* 2001; 409: 307-311].

#### **CDK Inhibitors Prevent Chemotherapy-Induced Alopecia in Animal Model**

Several synthetic inhibitors of the protein kinase CDK2 safely prevent chemotherapy-induced alopecia in rats. Many chemotherapeutic drugs exhibit cell-cycle-specific cytotoxic effects, and inhibiting cell cycle progression of normal hair cells may reduce these cytotoxic effects. The investigators developed and tested several synthetic compounds designed to specifically inhibit CDK2. In SCID mice transplanted with human scalp, topical treatment with CDK inhibitors produced similar inhibition of cell cycle progression, the results indicated. Pretreatment of human diploid fibroblast cells with one CDK2 inhibitor reduced the cytotoxicity of taxol, etoposide, cisplatin, 5-fluorouracil, and doxorubicin by factors of 5, 1.5, 8, 4, and 5, respectively. Furthermore, in a neonatal rat model of chemotherapy-induced alopecia, topical treatment with CDK2 inhibitors protected 50% of rats from etoposide-induced alopecia and protected 33% from alopecia after cyclophosphamide-doxorubicin treatment. The leading CDK2 inhibitor caused no apparent toxic effects in either animal model or in normal rat skin treated with the compound. On the basis of the

evidence, clinical trials in cancer patients to assess the efficacy of this approach to prevent chemotherapy-induced alopecia may be warranted.

[*Science* 2001; 291: 134-137]

#### **Long-Term Use of Non-aspirin NSAIDs Reduces Colorectal Cancer Risk**

Long-term use of non-aspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NA-NSAIDs) reduces the risk of colorectal cancer by half, independent of the treatment indication. Researchers conducted a population-based cohort study with secondary case-control analysis to examine the link between colorectal cancer risk and use of aspirin and individual NSAIDs, including the role of dose and duration. Using the General Practice Research Database in the UK, they traced 943,903 subjects who were between the ages of 40 and 79 years and who were free of cancer and colorectal adenoma from 1994 to 1997. They identified 2,002 incident cases of colorectal cancer. The incidence rate of colorectal cancer per 10,000 person-years was 7.3. After 6 months of continuous treatment, the risk of colorectal cancer was reduced in people who used NA-NSAIDs, with an adjusted relative risk of 0.5. High daily doses were associated with a slightly greater reduction than low-to-medium doses. One year after stopping NSAID treatment, the reduction in risk disappeared completely. According to the report, long-term users of aspirin at doses of 300 mg/day also had a reduced risk of developing colorectal cancer, with a relative risk of 0.6. However, there was no reduction in risk among those who used aspirin at daily doses of 75 mg and 150 mg. Based on these findings, 1-year treatment with NSAIDs would prevent one case of colorectal cancer in a population of 1,000 persons of 70 to 79 years of age.

[*Epidemiology* 2000; 12: 88-9]

# Thai Journal of Pharmacology

## Instruction for Authors

The Thai Journal of Pharmacology serves as the official journal of the Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand. The journal is designed to contribute to the publication of researches and information exchanges in the field of pharmacology and related fields. The manuscripts should not have been published before. Original full length scientific research papers, short communication, case report, letter to editor, minireviews, pharmacological digest and new drugs profile will be included in this journal.

### Manuscripts

Three copies of manuscripts, diskette(s) and illustration(s) are required. Manuscript of research articles should be written in English, the others can be either English or Thai. The preparation of the manuscript should be in the form of Microsoft Word (front: Times New Roman size 10). Pages should be numbered consecutively, including the title page.

Table and illustration should be numbered with Arabic figures consecutively in the order of first citation in the text and supply a brief title for each. Explain in footnote all non-standard abbreviation that are used. Illustrations should be professionally drawn and photographed or produced on a laser printer.

Nomenclature should follow the recommendations of the International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC), and the International Union for Biochemistry (IUB). All measurements must be in System International (SI) units.

### Research articles

The research papers should contain a) title, b) abstract, c) keywords, d) introduction, e) material and methods, f) result, g) discussion, and h) references.

**The title page:** Should contain the title of the article, author(s) name and affiliation (s) laboratory or institute of origin and address. Name and complete address of author responsible for correspondence about the manuscript should be also placed at the foot of the title page.

**An abstract:** Limited to approximately 250 words should be carried in this page. It should be informative and state concisely what was done, results obtained and conclusion.

**Keywords:** Three to ten keywords or short phrases appropriate for subject indexing should be typed at the bottom of abstract.

**Introduction:** State clearly the purpose of article, the rationale for the study or observation. Relevant previous study should be cited and do not review the subject extensively.

**Materials and Methods:** Describe the sufficient detail of the method, experimental subjects ( patients or experimental animals, including controls) clearly. Identify the method, apparatus (manufacturer's name and address in parenthesis). Give references to established method, study design and statistical method.

**Results:** Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Only important observations should be summarized and emphasized. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations.

**Discussion:** Comment on the results and integrate them with the existing knowledge and point out the field. Recommendation may also be included.

**Acknowledgement:** Persons, financial or technical helps which have contributed to the paper should be acknowledged in a paragraph.

**References:** Place the numbered references consecutively in the order in which they are first mention in the text. Use the style of the examples below:

### Examples

#### Articles in journals

(1) Standard journal article (List all authors, but if the number exceeds three, give three followed by et al)

You CH, Lee KY, Chen RY, et al. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, blotting and vomiting. *Gastroenterology* 1980; 79:311-314.

(2) Organisation as author

The Royal Marsden Hospital Bone-marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post-hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977;2:742-744.

(3) No author given

Coffee drinking and cancer of the pancreas (editorial). *BMJ* 1981;283-286.

(4) Volume with supplement

Magni F, Borghi S, Berti F. BN-52021 protects guinea-pig from heart anaphylaxis. *Pharmacol Res Commun* 1988;20 suppl 5:75-78.

(5) Books and other monographs

5.1 Personal author(s)

Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2<sup>nd</sup> rev ed. London: St. Paul, 1986.

5.2 Editor(s), compiler as author

Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York: Springer-Verlag, 1988.

5.3 Chapter in a book

Jaffe JH, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. In: Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, editors. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 6<sup>th</sup> ed. New York: MacMillan Publishing, 1980:494-543.

5.4 Conference proceedings

Vivian VL, editor. Child abuse and neglect: a medical community response. *Proceeding of the first AMA National Conference on Child Abuse and Neglect*; 1984; Mar 30-31; Chicago. Chicago: American Medical Association, 1985.

(6) Dissertation

Youseff NM. *School adjustment of children with congenital heart disease* (dissertation). Pittsburg (PA): Univ of Pittsburg, 1988.

(7) In press

Lillywhite HB, Donald JA. Pulmonary blood flow regulation in an aquatic snake. *Science*. In press.

## Reviews

All reviews are usually peer-reviewed. If the manuscript is written in Thai, English title and abstract are also required.

## Short communication

Short communication should contain new and unpublished results in a short form. It should not exceed 2 print pages and may contain one table and one illustration.

## Manuscript submission

All manuscripts are to be submitted to editor or associate editors, Thai Journal of Pharmacology, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Chulalongkorn Hospital, Rama IV Road, Bangkok 10330, Thailand. All papers will be critically reviewed by invited referees.

Reviewers' comments are usually returned to the authors. The editorial board will decide upon the time of publication and retain the right to modify the style of contribution. However, major changes will be agreed with the authors. Authors will receive 25 reprints free.

**Copyright**

The Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand holds the copyright on all material appearing in the journal.

## ใบบอกรับวารสารเภสัชวิทยา

วันที่ .....

เรียน ผู้จัดการวารสารเภสัชวิทยา

ข้าพเจ้า .....

ที่อยู่ .....

โทรศัพท์ .....

e-mail: .....

มีความประสงค์จะรับ วารสารเภสัชวิทยา ปีที่ ..... ฉบับที่ ..... เป็นต้นไป เป็นเวลา ..... ปี

พร้อมกันได้แนบเช็คไปรษณีย์หรือธนาคัตในนาม “ผู้จัดการวารสารเภสัชวิทยา”

ส่งจ่าย ป.ณ. ปทุมวัน เป็นจำนวนเงิน ..... บาท มาเป็นค่าสนับสนุนการจัดทำวารสารด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....

( )

หมายเหตุ อัตราค่าบอกรับวารสาร เภสัชวิทยา

1. สมาชิกสมาคมเภสัชวิทยา
2. สมาชิกวารสารเภสัชวิทยา
3. นิสิต/นักศึกษา (แสดงสำเนาบัตรประจำตัวนักศึกษา)

ไม่ต้องชำระค่าวารสาร

อัตราบอกรับปีละ 200 บาท ( 3 ฉบับ)

อัตราบอกรับปีละ 100 บาท ( 3 ฉบับ)

## สมาคมเกสส์วิทยาแห่งประเทศไทย

### ใบสมัครเข้าเป็นสมาชิก

เขียนที่ .....

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

นาย  
 ข้าพเจ้า นาง ..... ชื่อสกุล .....

นางสาว

อาชีพ ..... ขอสมัครเข้าเป็นสมาชิกสมาคมเกสส์วิทยาแห่งประเทศไทยและ  
 ขอรับรองว่าจะปฏิบัติตามระเบียบข้อบังคับของสมาคมทุกประการ

ข้าพเจ้ายินดีที่จะชำระค่าบำรุงสมาคมโดย

- เป็นรายปี ปีละ 200 บาทถ้วน สำหรับสมาชิกรายปี
- ครั้งเดียว 1,000 บาทถ้วน สำหรับสมาชิกตลอดชีพ  
 (ผ่อนชำระได้ 2 งวด งวดละ 500 บาท)

ลงชื่อผู้สมัคร .....

( )

## ทะเบียนประวัติ

- นาย
1. ชื่อ นาง ..... ชื่อสกุล .....
- นางสาว
- ชื่อภาษาอังกฤษ (ตัวพิมพ์ใหญ่) .....
2. เกิดวันที่.....เดือน.....พ.ศ.....
3. ตำแหน่งหน้าที่หรือตำแหน่งทางวิชาการในปัจจุบัน
- .....
4. สถานที่ทำงาน
- .....
- ..... โทรศัพท์/แฟกซ์ .....
- e-mail: .....
5. ที่อยู่ปัจจุบัน
- .....
- ..... โทรศัพท์/แฟกซ์ .....
6. ประวัติการศึกษาชั้นอุดมศึกษา (เรียงลำดับจากวุฒิสูงสุด)
- | ปี พ.ศ. | ชื่อสถานศึกษา | วุฒิที่ได้รับ |
|---------|---------------|---------------|
| .....   | .....         | .....         |
| .....   | .....         | .....         |
| .....   | .....         | .....         |
| .....   | .....         | .....         |
7. สาขาหรือแขนงวิชาที่สนใจหรือเชี่ยวชาญเป็นพิเศษ
- .....
- .....
- .....
- .....



## ประกาศ

รับสมัครเข้าศึกษาต่อใน  
**หลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต**  
**สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา**  
**บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**  
**ประจำปีการศึกษา 2544**

### คุณสมบัติของผู้สมัคร

#### สำหรับผู้สำเร็จปริญญาตรี

1. สำเร็จปริญญาบัณฑิตในสาขาวิทยาศาสตร์ด้านสุขภาพ ชีวภาพ และเคมี จากสถาบันอุดมศึกษาที่ทบวงมหาวิทยาลัยรับรอง และได้รับเกียรตินิยม
2. คุณสมบัติอื่น ๆ เป็นไปตามประกาศซึ่งบัณฑิตวิทยาลัยจะประกาศให้ทราบเป็นปี ๆ ไป หรือคณะกรรมการบริหารหลักสูตรพิจารณาแล้ว เห็นสมควรให้มีสิทธิ์เข้าสมัครศึกษาได้

#### สำหรับผู้สำเร็จปริญญาโท

1. สำเร็จปริญญาโทในสาขาวิชาเภสัชวิทยา และสาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพอื่น ๆ
2. คุณสมบัติอื่น ๆ เป็นไปตามประกาศซึ่งบัณฑิตวิทยาลัยจะประกาศให้ทราบเป็นปี ๆ ไป หรือคณะกรรมการบริหารหลักสูตรพิจารณาแล้ว เห็นสมควรให้มีสิทธิ์เข้าสมัครศึกษาได้

ติดต่อขอรายละเอียดและข้อใบสมัคร ได้ที่บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 2183501-3506 ตั้งแต่วันที่ 16- 30 เมษายน 2544

ติดต่อขอรายละเอียดได้ที่ รศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ โทรศัพท์ 2189732

หรือทาง e-mail: supatrasri@hotmail.com

รายนามคณะกรรมการที่ปรึกษาและบริหารสมาคมเภสัชวิทยาแห่งประเทศไทย  
วาระประจำปี พ.ศ. 2543-2545

คณะกรรมการที่ปรึกษา

พล.ต.สุนันท์ โรจนวิภาต  
รศ.พญ.กาญจนา เกษสอาด  
ศ.ดร.อำนาจ ติฐาพันธ์  
รศ.ดร.อรพรรณ มาตังคสมบัติ  
รศ.ดร.ประสาน ธรรมอุกรณ์  
รศ.พ.อ.ดร.ทัศนัย สุริยจันทร์  
รศ.พญ.สุนา ชมพูทวีป  
รศ.นสพ.พีระพล อยู่สวัสดิ์  
รศ.ดร.เมธี สรรพานิช  
รศ.วณิ ทวีทรัพย์  
รศ.ดร.ชวณี ทองโรจน์  
ดร.อุดม จันทรรักษ์ศรี

คณะกรรมการบริหาร

รศ.พ.อ.ดร.บพิตร กลางกัลยา

นายกสมาคม

อุปนายก

ผศ.ดร.สุรัชย์ อัญเชิญ

ผู้รั้งตำแหน่งนายกสมาคม

รศ.ดร.ศรีจันทร์ พรจิราศิลป์

เลขาธิการ

พ.อ.หญิงอรพินท์ รัตนจันทร์

ฝ่ายวิชาการ

รศ.ดร.กิตติมา ศรีวัฒนกุล

เหรียญกษาปณ์

ผศ.พ.อ.หญิงนิสามณี สัตยาบัน

ปฏิคม

รศ.ดร.พรทิพย์ ศุภวิไล

บรรณาธิการวารสาร

รศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

นายทะเบียน

รศ.สุพีชา วิทโยเลิศปัญญา

กรรมการกลาง

รศ.ดร.ชัยชาญ แสงดี

ผศ.ประภาวดี พัวไพโรจน์

ผศ.ดร.นพ.ประวิทย์ อัครเสรินนท์

ผศ.ทญ.วรางคณา ชิตช่วงชัย

ดร.ลัดดาวัลย์ ผิวทองงาม

ผศ.พ.ท.ดร.มทิรุทธ มุ่งถิ่น

For Treatment of Allergic Rhinitis  
and Idiopathic Chronic Urticaria

Once-a-day  
**CLARITYNE**<sup>®</sup>  
10 mg Tablet / 5 mg/5ml Syrup



**The Non-Sedating Antihistamine**



*She's Clear and in Control*

Further information available on request

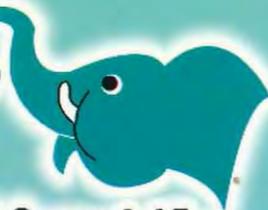
 Schering-Plough Ltd.

10<sup>th</sup> fl. Maneeya Centre Building, 518/5 Ploenchit Road, Patumwan, Bangkok 10330  
Tel. 254-4484-5, 254-8367, 254-8670-1 Fax 254-8367

ใบอนุญาตโฆษณาเลขที่ รศ. 680/2543

ONCE A DAY

# Nasonex<sup>®</sup>



mometasone furoate monohydrate

Aqueous Nasal Spray 0.05 %

*A structurally unique glucocorticoid designed to optimize local anti-inflammatory potency*



**Rx**  
Nasonex  
Nasal Spray, 50 mcg  
Sig : 2 sprays per nostril  
q.d.

Further information available on request

 Schering-Plough Ltd.

10 fl. Maneeya Centre Building, 518/5 Ploenchit Road, Patumwan, Bangkok 10330 Tel. 254-4484-5, 254-8367, 254-8670-1 Fax 254-8367

ใบอนุญาตโฆษณาเลขที่ รท. 681/2543